
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA
MESTRADO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA

**CÉLULAS-TRONCO DE CORDÃO UMBILICAL
HUMANO EM MODELO EXPERIMENTAL DE
HIPÓXIA-ISQUEMIA NEONATAL EM RATOS**

Simone de Paula

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade
de Medicina da PUC-RS para a obtenção do título de
Mestre em Saúde da Criança

Orientador: Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa
Co-orientador: Prof. Dr. Humberto Holmer Fiori

Porto Alegre, 2007

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

P324c Paula, Simone de

Células-tronco de cordão umbilical humano em modelo experimental de hipóxia-isquemia neonatal em ratos / Simone de Paula; orient. Jaderson Costa da Costa; co-orient. Humberto Holmer Fiori. Porto Alegre: PUCRS; 2007.

119f.: il. graf. tab.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina. Mestrado em Pediatria e Saúde da Criança.

1. CÉLULAS-TRONCO. 2. ASFIXIA NEONATAL. 3. CORDÃO UMBILICAL. 4. HIPÓXIA-ISQUEMIA ENCEFÁLICA. 5. MODELOS ANIMAIS. 6. ANIMAIS RECÉM-NASCIDOS. 7. RATOS WISTAR. 8. HUMANOS. I. Costa, Jaderson Costa da. II. Fiori, Humberto Holmer. II. Título.

C.D.D. 574.87

C.D.U. 612.649-08:616-001.8(043.3)

N.L.M. QU 325

Rosária Maria Lúcia Prenna Geremia
Bibliotecária CRB10/196

Dedicatória

Aos meus queridos pais, pelo exemplo de vida, pelo amor, dedicação, confiança e incentivo.

Agradecimentos

Aos meus orientadores, Dr. Jaderson Costa da Costa e Dr. Humberto Holmer Fiori, pelo suporte científico, pelo exemplo profissional, pela oportunidade de aprendizado e pelo incentivo durante a realização desse estudo.

Ao professores do Programa de Pós-graduação em Pediatria da PUC-RS, em especial, ao Dr. Renato Machado Fiori, pela confiança e pela oportunidade.

Aos queridos colegas e amigos do Laboratório de Neurociências, em especial a Simone Salamoni, Daniela Abreu, Zuzete Pires, Yanet Alves, Raquel Mattos Gianina Venturin, ao Ricardo Breda, Samuel Greggio, Affonso Santos Vitola, Mário Duarte e Davi de Paula, pela acolhida, pela amizade e pelo apoio essencial.

À Dra. Denise Cantarelli Machado e aos biólogos Jeremiah Mistrello Lubianca e Christian Viezzer, do Centro de Terapia Celular do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUC-RS, pelo auxílio na separação das células-tronco.

Às secretárias Carla, Ana e Nelcy, pela disposição em sempre ajudar.

Ao Dr. Mário Wagner, pelos ensinamentos metodológicos e pelo auxílio na análise estatística.

Ao Dr. Alexandre Dolganov, pelo auxílio na elaboração das micropipetas.

Ao Dr. Léder Xavier, pelo apoio nas avaliações histológicas.

Ao funcionário Tiago Giuliani Lopes, do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital São Lucas da PUC-RS, pela ajuda nas análises imuno-histoquímicas.

Ao Dr. Jefferson Braga, chefe do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da PUC-RS e ao técnico Gilmar, pelo apoio na realização das cirurgias.

Ao Dr. Martín Cammarota e à Pamela Billig Mello, do Centro de Memória do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUC-RS, pelas informações e pela ajuda na realização dos testes comportamentais.

Ao CNPQ, pelo fornecimento da bolsa de estudo, essencial para a dedicação a esta pesquisa.

À minha família, pelo ajuda e incentivo constantes.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv

CAPÍTULO I

REFERENCIAL TEÓRICO

1	REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
1.1	Encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal.....	17
1.1.1	Etiologia.....	18
1.1.2	Mecanismo patogênico	18
1.1.3	Manifestações clínicas	21
1.1.4	Correlações clínico-patológicas	23
1.1.5	Estratégias neuroprotetoras	25
1.1.6	Modelos animais para o estudo da hipóxia-isquemia neonatal	28
1.2	Células-tronco e doenças do sistema nervoso central.....	30
1.2.1	Células-tronco de cordão umbilical e encefalopatia hipóxico-isquêmica.....	33
1.3	Justificativa	36
1.4	Hipóteses alternativas	37
1.5	Objetivos	38
1.6	Referências bibliográficas	38

CAPÍTULO II

MATERIAIS E MÉTODOS

2	MATERIAIS E MÉTODOS	45
2.1	Animais	45
2.2	Fase I (piloto): modelo de hipóxia-isquemia neonatal	46
2.2.1	Indução da lesão hipóxico-isquêmica	46
2.2.2	Avaliação da memória espacial: labirinto aquático de Morris	48
2.2.3	Avaliação histológica	50
2.3	Fase II: uso de células-tronco em modelo experimental de hipóxia-isquemia.....	52
2.3.1	Grupos experimentais	52
2.3.2	Obtenção, preparo e administração das células-tronco de cordão umbilical humano	53
2.3.3	Avaliação da memória espacial: labirinto aquático de Morris	55
2.3.4	Experimento adicional: avaliação das funções neuromotoras.....	55
2.3.5	Avaliação histológica.....	61
2.4	Análise estatística	64
2.5	Cálculo amostral	64
2.6	Aspectos éticos	65
2.7	Referências bibliográficas	65

CAPÍTULO III

ARTIGO ORIGINAL

ABSTRACT	71
INTRODUCTION	72
MATERIALS AND METHODS	73
RESULTS.....	82
DISCUSSION	85
REFERENCES	89

CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES	100
-------------------------	------------

CAPÍTULO V

RESULTADOS COMPLEMENTARES

5	RESULTADOS COMPLEMENTARES.....	103
5.1	Resultados da fase I (piloto) no Labirinto Aquático de Morris	103
5.2	Correlação entre o método de delineamento e a contagem de pontos	104
5.3	Avaliação imuno-histoquímica	104

ANEXO

TERMO DE CONSENTIMENTO.....	108
------------------------------------	------------

APÊNDICE

BANCO DE DADOS.....	ii
----------------------------	-----------

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura II-1 - Etapas da indução da lesão hipóxico-isquêmica	48
Figura II-2 - Labirinto aquático de Morris	49
Figura II-3 - Método de administração intravenosa	55
Figura II-4 - Diagrama das etapas do estudo	56
Figura II-5 - Exploração no campo aberto	58
Figura II-6 - Teste do cilindro	59
Figura II-7 - Deslize no teste da caminhada na grade	60
Figura II-8 - Teste da trave.....	61
Figura II-9 - Métodos para estimativa do volume do hemisfério	63

CAPÍTULO III

Figure 1 - Morris water maze test	94
Figure 2 - Gross appearance of rat brain in sham-operated, saline and human umbilical cord blood groups three weeks after hypoxic-ischemic injury	95
Figure 3 - The mean volume of hemisphere in all groups.....	96
Figure 4 - Digitized images of Nissl-stained coronal sections of brain rat.....	97

CAPÍTULO V

Figura V-1 - Latência de escape no labirinto aquático de Morris nos cinco dias de treino	103
Figura V-2 - Gráfico de dispersão, mostrando a correlação entre a contagem de pontos e o método de delineamento para o cálculo do volume	104
Figura V-3 - Avaliação imuno-histoquímica do cérebro do rato 7 dias após o transplante de células-tronco de cordão umbilical humano	106

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III

Table 1- Motor performance in three groups of study	93
Table 2- Volume analysis of subareas of left and right hemispheres in HUCB cells, saline and sham-operated groups.....	93

CAPÍTULO V

Tabela V-1- Resultados do piloto no labirinto aquático de Morris três semanas após a indução da lesão.....	103
---	------------

LISTA DE ABREVIATURAS

ΣP	Soma dos pontos
μL	Microlitros
μm	Micrômetros
A	Área
A/P	Área ponto
AMPA	α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato
ATP	Adenosina trifosfato
BBB	<i>Blood brain barrier</i>
CA	Corno de Amon
Ca²⁺	Cálcio
cm	Centímetros
CT	Células-tronco
DAB	Diaminobenzidina
DP	Dia pós-natal
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
FEPPS	Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde
g	Gramas
h	Hora
HI	Hipóxia-isquemia
HUCB	<i>Human umbilical cord blood</i>

ip	Intraperitoneal
IR	<i>Interquartile range</i>
MAB	<i>Mouse Anti-human Nuclei Monoclonal Antibody</i>
ml	Mililitros
mm²	Milímetro quadrado
mm³	Milímetro cúbico
MWM	<i>Morris Water Maze</i>
n	<i>Sample size</i>
Na⁺	Sódio
NMDA	N-metil-D-aspartato
O₂	Oxigênio
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PFA	Paraformaldeído
PUC-RS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SD	<i>Standard deviation</i>
sec ou s	<i>Second</i> ou segundos
T	Distância
V (est)	Estimativa do volume

RESUMO

Introdução: A lesão hipóxico-isquêmica neonatal é uma causa importante de mortalidade e morbidade na infância, levando, freqüentemente, a retardo mental, epilepsia e paralisia cerebral. O sangue do cordão umbilical humano, rico em células-tronco adultas, é uma fonte potencial para a terapia celular em perinatologia.

Objetivo: Investigar os efeitos das células-tronco de cordão umbilical humano na memória de orientação espacial, no desempenho motor e nos desfechos histológicos em ratos neonatos submetidos à hipóxia-isquemia neonatal (HI).

Métodos: Ratos de 7 dias de vida foram submetidos à oclusão da artéria carótida direita seguida por exposição a ambiente hipóxico (8% O₂) por 2 h. Após vinte e quatro horas, os ratos receberam solução salina ou células-tronco de cordão umbilical humano por via intravenosa. Um grupo de animais cirurgia-simulada também foi adicionado. Após três semanas, a memória espacial foi avaliada através do labirinto aquático de Morris e as avaliações motoras aplicadas foram o campo aberto, os testes do cilindro, da grade e da trave. Subseqüentemente, os ratos foram sacrificados para as avaliações histológicas.

Resultados: Ratos com HI mostraram um significativo prejuízo na memória espacial e uma redução volumétrica do hemisfério ipsilateral à oclusão arterial. Nos testes motores, os animais submetidos à HI mostraram apenas uma tendência a déficits nos testes do cilindro e da grade. No entanto, os animais tratados com células-tronco de cordão umbilical humano não mostraram diferenças estatísticas nos testes comportamentais e na atrofia cerebral quando comparados ao grupo que recebeu solução salina.

Conclusão: Este estudo sugere que a injeção intravenosa de células-tronco de cordão umbilical humano não melhora os desfechos comportamentais e histológicos em ratos após HI severa. Investigações adicionais, considerando aspectos como dose, tempo para o transplante, métodos de injeção, uso de imunossupressão e de terapias associadas são necessárias para avaliar a relevância clínica da terapia celular na lesão cerebral neonatal.

Descritores: células-tronco, asfixia neonatal, cordão umbilical, modelos animais, hipóxia-isquemia encefálica.

ABSTRACT

Introduction: Hypoxic-ischemic injury is an important cause of mortality and morbidity in infants, often leading to mental retardation, epilepsy and cerebral palsy. Human umbilical cord blood (HUCB), which is rich in adult stem cells, is a potential source of cellular therapy in perinatology.

Objective: In this study, we investigated the effects of HUCB cells on motor, spatial orientation memory and histological outcome in neonate rats subjected to hypoxic-ischemic (HI) injury.

Methods: Seven-days-old rats underwent right carotid artery occlusion followed by exposure to 8% O₂ inhalation for 2 h. Twenty-four hours after HI injury, rats received either saline solution or HUCB cells intravenously. We also added a group of sham-operated animals. After three weeks, spatial orientation memory was assessed using Morris Water Maze and motor evaluations were conducted by open-field activity, cylinder, grid walking and ledged beam walking tests. Subsequently, rats were sacrificed for histological analyses.

Results: HI rats showed a significant spatial orientation memory impairment and a volumetric decrease of the ipsilateral hemisphere to arterial occlusion. In motor tests, animal subjected to HI injury showed only a tendency to deficits in cylinder and grid walking tests. However, animals that received HUCB cells did not show statistical difference in behavioral tests and cerebral atrophy when compared to saline group.

Conclusion: The present study suggests that intravenous injection of HUCB cells does not improve functional and histological outcomes in HI rats with severe brain damage. Additional investigations, considering aspects as dose, time to transplantation, delivery methods, immunosuppression and associated therapies are necessary to assessment the clinical relevance of cellular therapy in neonatal brain damage.

Key-words: umbilical cord blood, stem cells, hypoxic-ischemic brain injury, asphyxia, animal models.



CAPÍTULO I





Referencial Teórico



1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal

A encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal é a complicação imediata à asfixia grave e pode causar variados graus de dano cerebral. A *hipóxia* corresponde à falta de oxigênio completa ou parcial em um ou mais tecidos corporais, incluindo a circulação sangüínea (hipoxemia). A *isquemia* é a redução ou cessação do fluxo sangüíneo que leva à hipotensão sistêmica, parada cardíaca ou doença vascular oclusiva. Já o termo *asfixia* refere-se ao estado no qual a troca gasosa placentária e pulmonar é interrompida, levando à progressiva hipoxemia, associada à acidose metabólica e respiratória.¹

O diagnóstico da asfixia neonatal em recém-nascidos humanos é determinado por alguns critérios, tais como: 1) acidemia em sangue de cordão umbilical (pH < 7,0); 2) escore de Apgar de 0-3 por mais de 5 minutos; 3) manifestações neurológicas neonatais; e 4) disfunção orgânica sistêmica.² Ressalta-se que, em muitos estudos, o escore de Apgar tem sido utilizado como critério diagnóstico principal para a asfixia. No entanto, há uma elevada taxa de resultados falso-positivos e falso-negativos quando utilizado isoladamente.³

Estatísticas sugerem uma incidência de asfixia em 2-4 por 1000 nascimentos a termo. No Brasil, estima-se que a prevalência de asfixia neonatal seja de, aproximadamente, 2% dos nascidos-vivos.⁴ A taxa de mortalidade dos recém-

nascidos asfixiados no período neonatal é de 20 a 50%, e mais de 25% dos sobreviventes irão exibir incapacidades neuropsicológicas permanentes, incluindo retardo mental, paralisia cerebral, epilepsia e dificuldade de aprendizagem.^{5,6}

1.1.1 Etiologia

A causa mais freqüente da encefalopatia hipóxico-isquêmica é a severa asfixia intra-útero.⁷ Segundo Volpe⁸, somente em 10% dos recém-nascidos a hipóxia-isquemia se instala depois do nascimento, ou seja, cerca de 90% das lesões cerebrais perinatais têm origem no período intra-útero.

A asfixia intra-útero pode ser causada: 1) pela interrupção do fluxo sanguíneo umbilical (ex.: compressão de cordão umbilical); 2) pela insuficiente troca gasosa pela placenta (ex.: descolamento prematuro de placenta); e 3) pela perfusão placentária inadequada do lado materno (ex.: hipotensão materna). Outras situações patológicas que levem à hipóxia e à hipoperfusão teciduais pré-natais, perinatais ou pós-natais também são fatores etiológicos da hipóxia-isquemia neonatal.⁷

1.1.2 Mecanismo patogênico

O dano cerebral hipóxico-isquêmico é um processo evolutivo, o qual se inicia durante o insulto e estende-se no período de recuperação após a ressuscitação (lesão por reperfusão).⁹ O principal mecanismo patogênico atribuído à neuropatologia da hipóxia-isquemia neonatal é a redução do fluxo sanguíneo cerebral.¹⁰ Eventos tóxicos interligados, tais como, a falência energética, a

despolarização da membrana, a liberação de aminoácidos excitatórios, o acúmulo de radicais livres e a apoptose ocorrem simultaneamente e contribuem para a disfunção celular e a morte neuronal após insultos hipóxico-isquêmicos.^{11,12}

Em relação às respostas celulares, a redução do fluxo sanguíneo cerebral inicia uma cascata de eventos bioquímicos deletérios que duram horas ou dias. A depleção do oxigênio impossibilita a fosforilação oxidativa e ocorre uma mudança para o metabolismo anaeróbico. Este é um estado de energia ineficiente que resulta na rápida depleção de reservas de fosfato de alta energia, incluindo a molécula de adenosina trifosfato (ATP). A redução da síntese de ATP resultante da hipóxia acentuada altera o equilíbrio iônico através da membrana celular.^{10,13}

A falência na bomba de íons transcelulares resulta no acúmulo de cálcio (Ca^{2+}) extracelular enquanto que o sódio (Na^+) entra na célula carregando água (edema citotóxico). Conseqüentemente, a despolarização da membrana resulta em uma liberação de neurotransmissores excitatórios, especificamente o glutamato dos terminais axônicos. O glutamato, então, ativa os receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato) e cainato, resultando no influxo de Na^+ e Ca^{2+} para dentro dos neurônios pós-sinápticos, o que impede a recaptação de glutamato da fenda sináptica. O aumento de Ca^{2+} intracelular induz à produção do radical livre óxido nítrico. O efeito combinado de falência de energia celular, acidose, liberação de glutamato, aumento Ca^{2+}

intracelular e neurotoxicidade por óxido nítrico alteram os componentes celulares essenciais, levando à morte neuronal.^{10,12,14,15}

Estudos sugerem que os receptores de NMDA no cérebro em desenvolvimento se abrem mais facilmente, permitindo um fluxo aumentado de Ca^{2+} . A excitabilidade aumentada durante o desenvolvimento encefálico é necessária para promover a plasticidade neuronal atividade-dependente.¹²

Após a ressuscitação pós-natalmente na sala de parto, a oxigenação e a perfusão cerebral são restauradas. Durante esta fase de recuperação, as concentrações de metabólitos do fósforo e o pH intracelular retornam à linha de base. No entanto, o processo de falência energética cerebral retorna 6 a 48 horas mais tarde na fase secundária da lesão (fase de reperfusão). O mecanismo de falência energética secundária pode envolver a disfunção mitocondrial secundária a reações prolongadas dos insultos primários (por exemplo: influxo de Ca^{2+} , neurotoxicidade excitatória, formação de radicais livres). Estudos também sugerem que o desencadeamento da cascata inflamatória, com a liberação de citocinas, pode contribuir para a lesão cerebral.^{14,15}

Os mecanismos de morte neuronal em animais e humanos após a hipóxia-isquemia incluem necrose e apoptose. A necrose decorre de uma agressão intensa à célula, com inibição total das mitocôndrias, falência completa das bombas iônicas, edema celular, ruptura das organelas, lise das células, vazamento do citoplasma no

meio extracelular e presença de resposta inflamatória intensa com fagocitose. Trata-se de um processo passivo de morte celular.^{9,10}

A apoptose decorre da agressão lenta à célula, com inibição parcial da fosforilação oxidativa, redução do tamanho da célula e ruptura do DNA. A apoptose é um processo de “suicídio” ativo celular, desencadeado pela ativação de enzimas do grupo de caspases. A necrose celular é irreversível sob determinadas circunstâncias; já a apoptose pode ser revertida. Assim, em geral, no centro do tecido lesado forma-se uma região necrótica e, ao redor, há uma área em que a evolução pode ser tanto um processo regenerativo quanto a morte definitiva. Trata-se da chamada “zona de penumbra”, à qual vem se atribuindo importância crescente nas intervenções terapêuticas.^{9,10}

1.1.3 Manifestações clínicas

Os achados clínicos da encefalopatia hipóxico-isquêmica irão variar dependendo do período da lesão, da duração do insulto e dos mecanismos fetais de adaptação. Complicações sistêmicas da asfixia neonatal freqüentemente ocorrem, incluindo alterações cardiovasculares, respiratórias, metabólicas e renais. No entanto, o sistema nervoso central é a estrutura mais afetada.^{1,14}

As manifestações clínicas agudas dos recém-nascidos a termo com encefalopatia hipóxico-isquêmica incluem atraso na respiração espontânea ao nascimento, convulsões, alteração no nível de consciência, alteração do tônus,

apnéia, reflexo de Moro reduzido ou abolido, choro e sucção anormais e repostas pupilares alteradas.¹⁶

Convulsões no período neonatal ocorrem em 50-70% dos recém-nascidos asfixiados. O prognóstico é pior nas crianças que apresentam atividade convulsiva prolongada ou freqüente, particularmente, quando associada a um ultra-som de crânio ou um eletroencefalograma anormais no final da primeira semana. O padrão de tônus nas primeiras semanas de vida também parece ser um critério importante nos desfechos a longo-prazo.^{1,17}

Sarnat e Sarnat¹⁸ estabeleceram critérios para a classificação da encefalopatia hipóxico-isquêmica. No *estágio I* (leve), a criança apresenta-se hiperalerta; os reflexos tendinosos estão hiperativos e há ausência de convulsões. No *estágio II* (moderado), há presença de letargia, fraqueza proximal, redução dos reflexos primitivos e convulsões. No *estágio III* (severo), a criança apresenta-se torporosa e flácida, há ausência de reflexos tendinosos e primitivos e as convulsões são freqüentes.^{17,18}

Os neonatos com encefalopatia hipóxico-isquêmica leve geralmente não apresentam desfechos desfavoráveis a longo-prazo. No entanto, crianças no estágio moderado da lesão apresentaram seqüelas em 20-25% dos casos. No estágio grave, 50% dos casos evoluem para óbito e os sobreviventes apresentam seqüelas incapacitantes, tais como a paralisia cerebral.^{17,18}

Dados atuais indicam que a lesão cerebral hipóxico-isquêmica neonatal ocorre em aproximadamente 10 a 20% dos casos de paralisia cerebral. Crianças nos estágios I e II da encefalopatia hipóxico-isquêmica, freqüentemente, exibem déficits motores específicos dependendo da lesão, tais como a diplegia ou a hemiplegia espástica, geralmente sem transtornos cognitivos. Já as crianças na categoria III, usualmente, irão apresentar dificuldades motoras precoces, tais como atrasos no desenvolvimento neuropsicomotor e podem apresentar déficits cognitivos e epilepsia.³

1.1.4 Correlações clínico-patológicas

A presença, severidade e distribuição das lesões neuropatológicas originárias da hipóxia-isquemia dependem de diversos fatores, incluindo a natureza e a duração do insulto, a idade gestacional do feto ou recém-nascido e a presença ou ausência de estresse sistêmico. Fatores vasculares e metabólicos fazem um papel crítico, considerando que áreas específicas do desenvolvimento cerebral são especialmente sensíveis à hipóxia-isquemia.¹

A maioria dos episódios de hipóxia-isquemia severa causa lesões variadas a estruturas de grupos seletivos ao invés de lesões uniformes ou globais.¹⁹ Tais regiões incluem porções específicas do córtex cerebral, o hipocampo, os gânglios da base, o tálamo, o tronco encefálico e a substância branca periventricular e subcortical.¹

Há essencialmente cinco formas de lesão cerebral hipóxico-isquêmica: lesão cerebral parassagital, leucomalácia periventricular, lesão cerebral isquêmica multifocal ou focal, *status marmoratus* e necrose neuronal seletiva.^{3,7}

A lesão cerebral parassagital refere-se à necrose da substância cinzenta subcortical adjacente e cortical bilateral. A longo prazo, as crianças apresentam envolvimento, principalmente, das extremidades proximais e alterações cognitivas no desenvolvimento. Os déficits intelectuais se relacionam particularmente com as lesões localizadas posteriormente (regiões parieto-occipital-temporal), consideradas importantes para as funções auditivas e visuais.^{3,7,8}

Já a leucomalácia periventricular é a principal lesão isquêmica do neonato prematuro e refere-se à necrose da substância branca dorsal e lateral ao ventrículo lateral. As manifestações a longo prazo incluem diplegia espástica, quadriplegia espástica com déficits visuais e cognitivos.^{3,7,8}

A lesão cerebral isquêmica multifocal/focal é caracterizada por alterações em todos os tipos celulares (neurônios, oligodendrócitos e astrócitos) causadas pelo infarto dentro de uma distribuição vascular. A artéria cerebral média é o território vascular mais afetado. As manifestações neurológicas, a longo prazo, dependem da localização da lesão, mas são freqüentes convulsões focais, hemiparesia e alterações cognitivas no desenvolvimento (em 30% dos casos).^{3,7,8}

O *status marmoratus* é a mais rara lesão associada à hipóxia-isquemia neonatal. Caracteriza-se por lesão neuronal nos gânglios da base e tálamo e, geralmente, não ocorre isoladamente, mas sim, associada a outras manifestações neuropatológicas. A correlação clínica relacionada ao envolvimento dos gânglios da base é a anormalidade extrapiramidal, particularmente a coreoatetose e a distonia.^{3,7,8}

A necrose neuronal seletiva coexiste, invariavelmente, com uma ou mais lesões neuropatológicas e é encontrada mais freqüentemente no córtex cerebral, hipocampo e cerebelo. A seqüela neurológica inclui quadriparesia espástica, retardo mental e convulsões.^{3,7,8}

1.1.5 Estratégias neuroprotetoras

Apesar dos avanços tecnológicos e científicos nos cuidados perinatais dos recém-nascidos de risco, o manejo clínico de crianças asfixiadas tem sido limitado à manutenção da oxigenação, ao controle da pressão sanguínea e da homeostase, ao tratamento das convulsões e ao controle da hipertensão intracraniana. No entanto, essas medidas não são dirigidas à prevenção ou à interrupção dos mecanismos de lesão cerebral.^{1,3}

Em geral, as terapias neuroprotetoras são mais efetivas quando usadas como proteção ao invés de ressuscitação. Uma terapia protetora é um tratamento que se inicia antes de um evento adverso potencial; isso requer conhecimento dos fatores

de risco para o insulto cerebral. Já uma terapia de ressuscitação é um tratamento que se inicia após o dano adverso cerebral.²⁰ Atualmente, várias estratégias neuroprotetoras estão sendo avaliadas em modelos animais, na tentativa de reduzir a morte celular apoptótica e, assim, melhorar os desfechos comportamentais.²¹⁻²³

Atualmente, a hipotermia é considerada a terapia mais promissora no tratamento da síndrome hipóxico-isquêmica. O resfriamento da cabeça tem mostrado reduzir a extensão da lesão em modelos experimentais, assim como em estudos clínicos relacionados à isquemia e ao trauma. Os mecanismos potenciais de neuroproteção da hipotermia incluem inibição da liberação de glutamato, redução do metabolismo cerebral e inibição da apoptose. No entanto, aspectos como a duração da terapia, o grau de hipotermia, o momento e o método da intervenção e, principalmente, os efeitos adversos, tais como a hipoglicemia e a redução da contratibilidade miocárdica, ainda devem ser considerados.^{15,20}

Estudos experimentais sobre a hipotermia em lesões cerebrais isquêmicas também têm sido usados para avaliar o momento apropriado de intervenção, sugerindo a presença de uma janela terapêutica menor no período neonatal do que em adultos, indicando um curto período de menos de 6 horas após a lesão por reperfusão.^{10,20}

Outras estratégias neuroprotetoras da hipóxia-isquemia neonatal têm sido descritas experimentalmente incluindo inibidores de aminoácidos excitatórios,

radicais livres, óxido nítrico ou caspases, o uso de fatores de crescimento e do magnésio.^{24,25}

O uso de inibidores de glutamato ou de bloqueadores de sua ação pós-sináptica tem sido uma estratégia terapêutica lógica, levando em conta os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na síndrome hipóxico-isquêmica. O antagonista do NMDA MK-801 tem mostrado eficácia na redução da extensão da lesão em modelos animais adulto e neonatal.²⁵

Alguns estudos também têm discutido o papel do magnésio como agente neuroprotetor. O magnésio é um antagonista voltagem-dependente do receptor de NMDA, que pode auxiliar no bloqueio da neurotoxicidade induzida pelo glutamato.^{1,25} Estudos têm sido conduzidos para testar o efeito do magnésio na incidência de paralisia cerebral em prematuros.²⁴

Aspectos como a janela terapêutica, o diagnóstico precoce da encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal, a seleção dos pacientes, as questões de segurança, as variáveis de desfecho e o tamanho da amostra devem ser considerados no estudo de estratégias neuroprotetoras na lesão cerebral neonatal. Portanto, as novas abordagens de tratamento neuroprotetor ainda necessitam de mais evidências científicas.²⁰

1.1.6 Modelos animais para o estudo da hipóxia-isquemia neonatal

Os objetivos dos modelos animais são: (1) contribuir para o conhecimento dos mecanismos da injúria; (2) melhorar a compreensão sobre a evolução da injúria e os seus desfechos; e (3) fornecer um modelo no qual se desenvolvam e se testem estratégias terapêuticas. Ratos e camundongos são os animais mais comumente usados em modelos de asfixia perinatal.²⁶

O modelo experimental mais utilizado para a investigação da hipóxia-isquemia cerebral neonatal é o proposto por Rice et al., baseado no procedimento de Levine em ratos adultos²⁷⁻³², que consiste no dano cerebral hipóxico-isquêmico unilateral em ratos com 7 dias de idade obtido pela associação de oclusão unilateral da artéria carótida, com subsequente exposição a ambiente hipóxico. As lesões podem ser encontradas no hemisfério ipsilateral à oclusão da artéria carótida nas regiões do córtex cerebral, substância branca periventricular e subcortical, estriado (gânglios da base) e hipocampo. A região de CA3 (corno de Amon) no hipocampo é a região mais suscetível, seguida da camada de células granulares, CA1 e hilo.^{12,27,31}

O cérebro de ratos de 7 dias de idade tem sido histologicamente comparado ao desenvolvimento cerebral de fetos com 32-34 semanas de idade, ou seja, a camada cortical está completa, a matriz germinativa está regredindo e há pouca mielinização na substância branca.^{30,31}

Os parâmetros fisiológicos do modelo têm mostrado, que durante o insulto, o filhote de rato torna-se hipóxico e hipocapnéico como resultado da hiperventilação. A média da pressão sanguínea cai aproximadamente 25% e há uma redução no fluxo sangüíneo cerebral entre 17 e 40% quando comparado ao controle, especialmente nas áreas mais vulneráveis ao dano.²⁶

Neste modelo, as mudanças histopatológicas ocorrem consistentemente e de uma forma previsível. Além disso, o animal é de fácil manuseio, os estudos são facilmente desempenhados e o custo financeiro é modesto.^{27,31,33} No entanto, deve-se considerar que o animal não é grande o bastante para permitir freqüentes mensurações bioquímicas ou avaliar efeitos sistêmicos (cardiovascular, renal e pulmonar) das intervenções terapêuticas. Também há uma dificuldade na produção de injúrias da substância branca.^{30,33}

Aproximadamente 79% dos filhotes de ratos sobrevivem ao experimento e cerca de 90% dos sobreviventes apresentam danos cerebrais. Infarto do córtex cerebral ipsilateral e do hipocampo estão presentes em 56% e, dependendo da duração da sobrevivência pós-asfixia, achados adicionais também são vistos, incluindo alterações na função neurológica e comportamental.³³

Uma variedade de outros protocolos para indução da asfixia perinatal também têm sido propostos, porém menos estudados.^{5,34-38}

1.2 Células-tronco e doenças do sistema nervoso central

As células-tronco representam uma unidade natural do desenvolvimento embrionário e da reparação tecidual e são um subconjunto de células imaturas, indiferenciadas e não-especializadas que apresentam a capacidade de se auto-regenerar e de originar diferentes linhagens celulares.³⁹

Recentes descobertas revolucionaram a biologia das células-tronco e têm demonstrado o potencial clínico destas células em uma variedade de doenças humanas. As células-tronco têm sido encontradas em órgãos como o cérebro e o coração, previamente conhecidos pela carência de progenitores celulares e de potencial regenerativo.⁴⁰

Vários tipos de células-tronco têm sido identificadas no embrião, no feto e no tecido adulto. As células-tronco embrionárias são derivadas do blastocisto e são consideradas pluripotentes, ou seja, apresentam a capacidade de originar mais de 200 tipos diferentes de linhagens celulares. As células-tronco fetais representam os progenitores celulares originários de órgãos fetais em desenvolvimento. O uso de células-tronco fetais ou embrionárias origina sérias questões biológicas, éticas e legais, limitando a utilização destas células na pesquisa clínica.⁴¹

Células-tronco adultas ou somáticas são responsáveis pelo reabastecimento tecidual ao longo da vida e estão presentes em todos os tecidos. No entanto, em órgãos como o coração e o cérebro, as células-tronco não parecem ser ativadas

suficientemente para recolocar as células danificadas.⁴² Estas células têm sido utilizadas terapeuticamente por muitos anos em doenças hematológicas malignas, através do transplante de medula óssea ou de sangue de cordão umbilical.^{41,43,44} Atualmente, a maioria das pesquisas clínica e experimental explora o uso das células-tronco hematopoiéticas para outros tipos de doenças.⁴⁵

A manutenção de muitos tecidos e órgãos é dada pelas células-tronco tecido-específicas que, na presença de estímulos apropriados, se proliferam e se diferenciam.⁴⁶ Atualmente, o termo “plasticidade”, ou seja, a capacidade de tipos celulares de tecidos adultos se diferenciarem em linhagens celulares das três camadas germinativas, tem sido proposto.⁴² Mezey et al.^{47,48} demonstraram em seu estudo com humanos que células-tronco da medula óssea se transdiferenciaram em células nervosas no cérebro adulto.

Recentemente, estudos têm demonstrado que o transplante de células-tronco tem melhorado a função em modelos de isquemia cerebral, doença de Parkinson, doença de Huntington e traumatismo raquimedular.^{41,49,50} No entanto, pouco é conhecido sobre os mecanismos responsáveis por esta melhora funcional. Acredita-se que alguns mecanismos estejam envolvidos neste processo, tais como a transdiferenciação, a fusão celular, o comportamento celular e a produção de fatores tróficos.⁴⁴

O momento adequado para o transplante, a melhor via de administração das células-tronco (sistêmica versus local e intra-arterial versus endovenosa), o tipo de célula apropriada e os critérios de seleção dos pacientes ainda são aspectos pouco conhecidos da terapia celular.

A literatura refere uma variabilidade de intervalos para transplante de células-tronco pós-isquemia. Muitos estudos demonstram uma recuperação funcional com o uso de progenitores celulares transplantados nos 3 primeiros dias pós-isquemia. No entanto, essa recuperação também tem sido encontrada com a liberação tardia das células-tronco, como por exemplo, um mês pós-insulto.^{51,52}

Em relação à rota de transplante, Jin et al.⁵³ demonstraram que todas as vias de administração das células-tronco resultaram em migração para o sítio de lesão. No entanto, um número maior de células foi encontrado com o uso do transplante intracerebral em comparação com a injeção intraventricular e endovenosa.

A via de administração também dependerá do tipo celular administrado e dos mecanismos de ação das células. Estudos com o uso de células-tronco da medula óssea⁵⁴⁻⁵⁶ e do cordão umbilical⁵⁷⁻⁶⁰ em modelos animais de isquemia têm demonstrado melhora sensório-motora após a terapia celular. No entanto, poucas células são encontradas no cérebro e uma pequena porcentagem expressa marcadores neurais. Acredita-se que as células transplantadas secretem fatores tróficos para aumentar os mecanismos endógenos de reparação cerebral.

A neurotoxicidade de muitos distúrbios neurológicos pode resultar na morte das células-tronco transplantadas. Por outro lado, o ambiente neuronal durante a fase precoce de recuperação na isquemia, por exemplo, pode facilitar o crescimento, a sobrevivência e a transdiferenciação das células-tronco implantadas.^{61,62}

1.2.1 Células-tronco de cordão umbilical e encefalopatia hipóxico-isquêmica

Uma das mais promissoras aplicações do sangue de cordão umbilical humano é a lesão cerebral no período neonatal. A facilidade de coleta, sem riscos para a gestante e o neonato e o grande número de células disponíveis são as principais vantagens para a utilização desta fonte de células. Além disso, o sangue do cordão umbilical pode ser usado terapêuticamente no período perinatal ou criopreservado para o uso tardio.^{63,64}

O sangue do cordão umbilical e placentário tem sido reconhecido como uma fonte alternativa de células-tronco hematopoiéticas para o transplante em pacientes adultos e pediátricos. As células-tronco do cordão umbilical são mais imaturas e o sangue do cordão umbilical e placentário é altamente enriquecido com progenitores celulares hematopoiéticos, mesenquimais e endoteliais.⁶⁵⁻⁶⁷ Além disso, as células-tronco são mais abundantes no cordão umbilical e apresentam um potencial proliferativo e migratório mais elevado em comparação aos progenitores da medula óssea.^{62,63}

Mecanismos de plasticidade *in vitro* fortemente sugerem que as células-tronco de cordão umbilical podem representar uma alternativa viável para a regeneração cerebral.⁶² Alguns estudos sugerem que estas células têm a capacidade de se transdiferenciar em progenitores não-hematopoiéticos, incluindo as células nervosas.^{66,68} Pesquisas *in vivo* também têm demonstrado o potencial dessas células na melhora funcional após isquemia⁶⁰, esclerose lateral amiotrófica⁶⁹, traumatismo crânio-encefálico⁷⁰ e traumatismo raqui-medular⁷¹ em modelos animais. No entanto, pesquisas sobre o uso de progenitores celulares do cordão umbilical e da placenta ainda são escassos.⁶²

Chen et al.⁶⁰ realizaram os primeiros estudos sobre o uso de células-tronco de cordão umbilical humano em ratos submetidos à oclusão da artéria cerebral média e demonstraram que a injeção intravenosa de células-tronco auxiliou na melhora dos animais transplantados. As células-tronco do doador foram detectadas no córtex afetado, subcórtex e estriado.

Um subsequente estudo mostrou melhora no comportamento de ratos após 4 meses de oclusão da artéria cerebral média. A migração foi observada apenas no hemisfério lesado e a melhor recuperação foi correlacionada às altas doses de células-tronco de cordão umbilical humano infundidas.⁵⁷

Os estudos citados acima têm demonstrado que a lesão tecidual é um fator crítico para “atrair” as células-tronco de cordão umbilical e iniciar o processo de

reparação. A liberação de fatores tróficos no sítio da lesão pode, simultaneamente, promover a migração seletiva de progenitores celulares do doador e também acelerar o reparo tecidual.⁶²

Borlongan et al.⁷² não detectaram a presença de células-tronco de cordão umbilical humano em ratos transplantados, apesar da prévia permeabilização da barreira hemato-encefálica pelo Manitol. A redução da área do infarto levou os investigadores a sugerir que a melhora após a isquemia foi mediada por fatores tróficos e moleculares. Ainda se desconhece a influência da barreira hemato-encefálica nos transplantes periféricos de células-tronco, mas em modelos de hipóxia-isquemia, há evidências de que a integridade da barreira está alterada nas primeiras 24h após o insulto, especialmente no córtex cerebral.²⁹

Enfatiza-se que a segurança de transplantes xenogênicos nestes estudos foi determinada pela ausência de anormalidades histológicas ou comportamentais nos ratos transplantados. O uso de imunossupressores ainda diverge entre os pesquisadores.⁶²

Há poucos estudos sobre o uso de células-tronco na encefalopatia hipóxico-isquêmica.⁷³ Recentemente, Yasuhara et al.⁷⁴ observaram melhora no déficit motor de ratos submetidos a um modelo de hipóxia-isquemia neonatal que receberam transplante intracerebral de células-tronco humanas.

Também em recente trabalho, Meier et al.⁷⁵ demonstraram que a injeção intraperitoneal de 1×10^7 de células mononucleares de cordão umbilical humano 24h após a lesão hipóxico-isquêmica em roedores neonatos resultou na melhora do padrão de marcha dos animais. As células-tronco migraram para a região da lesão, porém não se observou sinais de transdiferenciação.

1.3 Justificativa

A hipóxia-isquemia neonatal é a causa mais importante de dano neurológico no recém-nascido e resulta em severas morbidades no neurodesenvolvimento, tais como a paralisia cerebral e a epilepsia. Apesar da significância clínica e socioeconômica da lesão cerebral neonatal, existem poucas estratégias para reduzir a morbidade e mortalidade relacionadas a esta doença. O tratamento tem sido limitado a medidas de suporte e não se dirige à restauração do processo de lesão cerebral neonatal, visto que o sistema nervoso apresenta uma capacidade de regeneração auto-limitada em resposta a um insulto.

A terapia celular tem sido utilizada na reparação de tecidos e órgãos lesados, através da utilização de células-tronco e fatores de proliferação em alvos terapêuticos considerados incapazes de desenvolver processos regenerativos, tais como o coração e o cérebro.

A medula óssea e o sangue de cordão umbilical são fontes de células-tronco com potencial terapêutico para a utilização em diversas doenças, inclusive em

lesões cerebrais. Uma das mais promissoras aplicações do sangue de cordão umbilical humano é a lesão cerebral no período neonatal, especialmente pela facilidade de coleta e pelo grande número de células disponíveis.

Diversos estudos em modelos experimentais e em humanos têm mostrado avanços na recuperação de doenças auto-imunes e lesões do sistema nervoso central através do transplante de células-tronco adultas. No entanto, ainda se desconhece o seu potencial terapêutico, especialmente nas lesões neurológicas em recém-nascidos, exigindo, assim, um estudo experimental para fornecer indicações prévias sobre a possibilidade das células-tronco apresentarem efeito terapêutico e segurança.

1.4 Hipóteses alternativas

A memória de orientação espacial, o desempenho motor e as alterações histológicas são piores em ratos submetidos ao modelo de hipóxia-isquemia neonatal se comparados aos animais cirurgia-simulada.

A memória de orientação espacial, o desempenho motor e as alterações histológicas são melhores nos ratos submetidos ao modelo de hipóxia-isquemia neonatal e tratados com células-tronco de cordão umbilical humano se comparados aos animais lesados e tratados com solução salina.

1.5 Objetivos

O objetivo geral deste estudo é verificar os efeitos da injeção das células-tronco de cordão umbilical humano em modelo experimental de hipóxia-isquemia neonatal em ratos.

Os objetivos específicos consistem em:

(1) Testar um modelo experimental de hipóxia-isquemia neonatal em ratos;

(2) Comparar as funções neuromotoras e a memória de orientação espacial entre os três grupos de estudo: animais hipóxico-isquêmicos tratados com células-tronco de cordão umbilical humano, hipóxico-isquêmicos tratados com solução salina e cirurgia-simulada (grupo *sham*).

(3) Comparar o volume do hemisfério acometido nos três grupos: animais hipóxico-isquêmicos tratados com células-tronco de cordão umbilical humano, hipóxico-isquêmicos tratados com solução salina e cirurgia-simulada.

1.6 Referências bibliográficas

- 1 Vannucci RC. Hypoxic-ischemic encephalopathy. *Am J Perinatol* 2000;17:113-120.
 - 2 Penela-Velez de Guevara MT, Gil-Lopez SB, Martin-Puerto MJ, Romero-Escos MD, Herrera-Martin M, Urbon-Artero A. A descriptive study of perinatal asphyxia and its sequelae. *Rev Neurol* 2006;43:3-6.
 - 3 Perlman JM. Intrapartum hypoxic-ischemic cerebral injury and subsequent cerebral palsy: medicolegal issues. *Pediatrics* 1997;99:851-859.
-

- 4 Souza F. Fatores de risco associados a asfixia perinatal no Brasil. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2003.
 - 5 Weitzdoerfer R, Pollak A, Lubec B. Perinatal asphyxia in the rat has lifelong effects on morphology, cognitive functions, and behavior. *Semin Perinatol* 2004;28:249-256.
 - 6 Vannucci SJ, Hagberg H. Hypoxia-ischemia in the immature brain. *J Exp Biol* 2004;207:3149-3154.
 - 7 Berger R, Garnier Y. Pathophysiology of perinatal brain damage. *Brain Res Brain Res Rev* 1999;30:107-134.
 - 8 Volpe J. *Neurology of the Newborn*. 4 ed. Philadelphia: WB Saunders; 2000.
 - 9 Sherman MP. Interventions for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 1998;102:662.
 - 10 Perlman JM. Summary proceedings from the neurology group on hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 2006;117:S28-33.
 - 11 Vexler ZS, Ferriero DM. Molecular and biochemical mechanisms of perinatal brain injury. *Semin Neonatol* 2001;6:99-108.
 - 12 Hossain MA. Molecular mediators of hypoxic-ischemic injury and implications for epilepsy in the developing brain. *Epilepsy Behav* 2005;7:204-213.
 - 13 Golan H, Huleihel M. The effect of prenatal hypoxia on brain development: short- and long-term consequences demonstrated in rodent models. *Dev Sci* 2006;9:338-349.
 - 14 Perlman JM. Brain injury in the term infant. *Semin Perinatol* 2004;28:415-424.
 - 15 Shalak L, Perlman JM. Hypoxic-ischemic brain injury in the term infant-current concepts. *Early Hum Dev* 2004;80:125-141.
 - 16 Fahey J, King TL. Intrauterine asphyxia: clinical implications for providers of intrapartum care. *J Midwifery Womens Health* 2005;50:498-506.
 - 17 Cowan F. Outcome after intrapartum asphyxia in term infants. *Semin Neonatol* 2000;5:127-140.
 - 18 Sarnat H, Sarnat M. Neonatal encephalopathy following fetal distress. A clinical and electroencephalographic study. *Arch Neurol* 1976;33:696-705.
 - 19 Johnston MV, Trescher WH, Ishida A, Nakajima W. Neurobiology of hypoxic-ischemic injury in the developing brain. *Pediatr Res* 2001;49:735-741.
 - 20 Shankaran S, Lupton A. Challenge of conducting trials of neuroprotection in the asphyxiated term infant. *Semin Perinatol* 2003;27:320-332.
 - 21 Johnston MV, Trescher WH, Ishida A, Nakajima W. Novel treatments after experimental brain injury. *Semin Neonatol* 2000;5:75-86.
 - 22 Kennea NL, Mehmet H. Perinatal applications of neural stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004;18:977-994.
 - 23 Lee SR, Kim SP, Kim JE. Protective effect of topiramate against hippocampal neuronal damage after global ischemia in the gerbils. *Neurosci Lett* 2000;281:183-186.
 - 24 Berger R, Garnier Y, Jensen A. Perinatal Brain Damage: underlying mechanisms and neuroprotective strategies. *J Soc Gynecol Investig* 2002;9:319-328.
 - 25 Gluckman PD, Pinal CS, Gunn AJ. Hypoxic-ischemic brain injury in the newborn: pathophysiology and potential strategies for intervention. *Semin Neonatol* 2001;6:109-120.
-

- 26 Yager JY. Animal models of hypoxic-ischemic brain damage in the newborn. *Semin Pediatr Neurol* 2004;11:31-46.
 - 27 Vannucci RC, Vannucci SJ. A model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Ann N Y Acad Sci* 1997;835:234-249.
 - 28 Levine S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol* 1960;36:1-17.
 - 29 Vannucci RC, Vannucci SJ. Perinatal hypoxic-ischemic brain damage: evolution of an animal model. *Dev Neurosci* 2005;27:81-86.
 - 30 Roohey T, Raju TN, Moustogiannis AN. Animal models for the study of perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy: a critical analysis. *Early Hum Dev* 1997;47:115-146.
 - 31 Vannucci RC, Connor JR, Mauger DT, Palmer C, Smith MB, Towfighi J, et al. Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *J Neurosci Res* 1999;55:158-163.
 - 32 Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* 1981;9:131-141.
 - 33 Raju T. Some animal models for the study of perinatal asphyxia. *Biol Neonate* 1992;62:202-214.
 - 34 Grojean S, Schroeder H, Pourie G, Charriaut-Marlangue C, Koziel V, Desor D, et al. Histopathological alterations and functional brain deficits after transient hypoxia in the newborn rat pup. *Neurobiol Dis* 2003;14:265-278.
 - 35 Uehara H, Yoshioka H, Kawase S, Nagai H, Ohmae T, Hasegawa K, et al. A new model of white matter injury in neonatal rats with bilateral carotid artery occlusion. *Brain Res* 1999;837:213-220.
 - 36 Buwalda B, Nyakas C, Vosselman H, Luiten P. Effects of early postnatal anoxia on adult learning and emotion in rats. *Behav Brain Res* 1995;67:85-90.
 - 37 Hagberg H, Peebles D, Mallard C. Models of white matter injury: comparison of infectious, hypoxic-ischemic, and excitotoxic insults. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2002;8:30-38.
 - 38 Jensen FE, Holmes GL, Lombroso CT, Blume HK, Firkusny IR. Age-dependent changes in long-term seizure susceptibility and behavior after hypoxia in rats. *Epilepsia* 1992;33:971-980.
 - 39 Li L, Xie T. Stem Cell Niche: Structure and Function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005.
 - 40 Kaji EH, Leiden JM. Gene and stem cell therapies. *Jama* 2001;285:545-550.
 - 41 Haas S, Weidner N, Winkler J. Adult stem cell therapy in stroke. *Curr Opin Neurol* 2005;18:59-64.
 - 42 Alison MR, Lovell MJ, Direkze NC, Wright NA, Poulson R. Stem cell plasticity and tumour formation. *Eur J Cancer* 2006;42:1247-1256.
 - 43 Daley GQ, Goodell MA, Snyder EY. Realistic prospects for stem cell therapeutics. *Hematology* 2003;398-418.
 - 44 Rice CM, Scolding NJ. Adult stem cells--reprogramming neurological repair? *Lancet* 2004;364:193-199.
 - 45 Nash RA. Allogeneic HSCT for autoimmune diseases: conventional conditioning regimens. *Bone Marrow Transplant* 2003;32 Suppl 1:77-80.
 - 46 Serakinci N, Keith WN. Therapeutic potential of adult stem cells. *Eur J Cancer* 2006;42:1243-1246.
-

- 47 Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 2000;290:1779-1782.
- 48 Mezey E, Key S, Vogelsang G, Szalayova I, Lange GD, Crain B. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:1364-1369.
- 49 Dunnett SB, Rosser AE. Cell therapy in Huntington's disease. *NeuroRx* 2004;1:394-405.
- 50 Koda M, Okada S, Nakayama T, Koshizuka S, Kamada T, Nishio Y, et al. Hematopoietic stem cell and marrow stromal cell for spinal cord injury in mice. *Neuroreport* 2005;16:1763-1767.
- 51 Bliss T, Guzman R, Daadi M, Steinberg GK. Cell transplantation therapy for stroke. *Stroke* 2007;38:817-826.
- 52 Shen LH, Li Y, Chen J, Zacharek A, Gao Q, Kapke A, et al. Therapeutic benefit of bone marrow stromal cells administered 1 month after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007;27:6-13.
- 53 Jin K, Sun Y, Xie L, Mao XO, Childs J, Peel A, et al. Comparison of ischemia-directed migration of neural precursor cells after intrastriatal, intraventricular, or intravenous transplantation in the rat. *Neurobiol Dis* 2005;18:366-374.
- 54 Borlongan CV, Evans A, Yu G, Hess DC. Limitations of intravenous human bone marrow CD133+ cell grafts in stroke rats. *Brain Res* 2005;1048:116-122.
- 55 Li Y, Chen J, Chen X, Wang L, Gautam S, Xu Y, et al. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: Neurotrophins and functional recovery. *Neurology* 2002;59:514-523.
- 56 Chen J, Zhang ZG, Li Y, Wang L, Xu YX, Gautam SC, et al. Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats. *Circ Res* 2003;92:692-699.
- 57 Vendrame M, Cassady J, Newcomb J, Butler T, Pennypacker KR, Zigova T, et al. Infusion of human umbilical cord blood cells in a rat model of stroke dose-dependently rescues behavioral deficits and reduces infarct volume. *Stroke* 2004;35:2390-2395.
- 58 Vendrame M, Gemma C, de Mesquita D, Collier L, Bickford PC, Sanberg CD, et al. Anti-inflammatory effects of human cord blood cells in a rat model of stroke. *Stem Cells Dev* 2005;14:595-604.
- 59 Willing AE, Lixian J, Milliken M, Poulos S, Zigova T, Song S, et al. Intravenous versus intrastriatal cord blood administration in a rodent model of stroke. *J Neurosci Res* 2003;73:296-307.
- 60 Chen J, Sanberg PR, Li Y, Wang L, Lu M, Willing AE, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke* 2001;32:2682-2688.
- 61 Savitz SI, Dinsmore JH, Wechsler LR, Rosenbaum DM, Caplan LR. Cell therapy for stroke. *NeuroRx* 2004;1:406-414.
- 62 Sanberg PR, Willing AE, Garbuzova-Davis S, Saporta S, Liu G, Sanberg CD, et al. Umbilical cord blood-derived stem cells and brain repair. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1049:67-83.
-

- 63 Kogler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Muschen M, Feldhahn N, et al. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 2004;200:123-135.
- 64 Santner-Nanan B, Peek MJ, McCullagh P, Nanan R. Therapeutic potential of stem cells in perinatal medicine. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2005;45:102-107.
- 65 Brunstein CG, Wagner JE. Umbilical cord blood transplantation and banking. *Annu Rev Med* 2006;57:403-417.
- 66 Chen N, Hudson JE, Walczak P, Misiuta I, Garbuzova-Davis S, Jiang L, et al. Human umbilical cord blood progenitors: the potential of these hematopoietic cells to become neural. *Stem Cells* 2005;23:1560-1570.
- 67 Nan Z, Grande A, Sanberg CD, Sanberg PR, Low WC. Infusion of human umbilical cord blood ameliorates neurologic deficits in rats with hemorrhagic brain injury. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1049:84-96.
- 68 Sanchez-Ramos JR, Song S, Kamath SG, Zigova T, Willing A, Cardozo-Pelaez F, et al. Expression of neural markers in human umbilical cord blood. *Exp Neurol* 2001;171:109-115.
- 69 Garbuzova-Davis S, Willing AE, Zigova T, Saporta S, Justen EB, Lane JC, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood cells in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: distribution, migration, and differentiation. *J Hematother Stem Cell Res* 2003;12:255-270.
- 70 Lu D, Sanberg PR, Mahmood A, Li Y, Wang L, Sanchez-Ramos J, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces neurological deficit in the rat after traumatic brain injury. *Cell Transplant* 2002;11:275-281.
- 71 Zhao ZM, Li HJ, Liu HY, Lu SH, Yang RC, Zhang QJ, et al. Intraspinal transplantation of CD34+ human umbilical cord blood cells after spinal cord hemisection injury improves functional recovery in adult rats. *Cell Transplant* 2004;13:113-122.
- 72 Borlongan CV, Hadman M, Sanberg CD, Sanberg PR. Central nervous system entry of peripherally injected umbilical cord blood cells is not required for neuroprotection in stroke. *Stroke* 2004;35:2385-2389.
- 73 Park KI. Transplantation of neural stem cells: cellular & gene therapy for hypoxic-ischemic brain injury. *Yonsei Med J* 2000;41:825-835.
- 74 Yasuhara T, Matsukawa N, Yu G, Xu L, Mays RW, Kovach J, et al. Behavioral and histological characterization of intrahippocampal grafts of human bone marrow-derived multipotent progenitor cells in neonatal rats with hypoxic-ischemic injury. *Cell Transplant* 2006;15:231-238.
- 75 Meier C, Middelanis J, Wasielewski B, Neuhoff S, Roth-Haerer A, Gantert M, et al. Spastic paresis after perinatal brain damage in rats is reduced by human cord blood mononuclear cells. *Pediatr Res* 2006;59:244-249.
-



CAPÍTULO II



Materials e Métodos

2 MATERIAIS E MÉTODOS

No período de outubro de 2005 a março de 2007, realizou-se um estudo em modelo experimental, randomizado, cego, e controlado. A pesquisa foi dividida em duas fases experimentais: fase I (piloto), estabelecimento do modelo de hipóxia-isquemia perinatal; e fase II, utilização de células-tronco de cordão umbilical humano em modelo experimental de hipóxia-isquemia neonatal.

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Neurociências do Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS) e no Laboratório de Cirurgia Experimental e Microcirurgia da mesma instituição.

2.1 Animais

Ninhadas de ratos Wistar provenientes do biotério da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) foram mantidas no alojamento para animais do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS em ambiente climatizado ($21 \pm 1^\circ \text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12 horas, com água e comida *ad libitum*. Na terceira semana de vida, os filhotes foram separados de suas mães e, então, desmamados. As ninhadas utilizadas no estudo foram padronizadas de 8 a 10 animais.

Os protocolos experimentais utilizados seguiram as normas internacionais de experimentação com animais de laboratório. Todos os procedimentos foram realizados tomando os cuidados necessários para reduzir ao máximo o número de animais empregados e o seu sofrimento.

2.2 Fase I (piloto): modelo de hipóxia-isquemia neonatal

2.2.1 Indução da lesão hipóxico-isquêmica

Para o desenvolvimento de um modelo de hipóxia-isquemia perinatal foram utilizados 10 filhotes de ratos Wistar no dia pós-natal 7 (DP7), provenientes de uma única ninhada. Os filhotes foram divididos em dois grupos de estudo: grupo experimental (n=6) e grupo com cirurgia-simulada (*sham*) (n=4), considerado controle.

Os animais do grupo experimental foram submetidos a um modelo de lesão cerebral hipóxico-isquêmica perinatal previamente descrito por vários autores.¹⁻⁷ Os animais DP7 foram anestesiados com halotano através de uma máscara anestésica. A artéria carótida comum direita foi identificada através da incisão transversal na linha média da face anterior do pescoço, isolando o nervo vago, e ocluída permanentemente em dois locais com linha cirúrgica de seda 7.0 (Figura II-1A), utilizando-se microscópio cirúrgico durante os procedimentos.

Os animais ficaram em observação sob luz aquecida por 10-15 minutos após o procedimento cirúrgico e a sutura, quando então, foram devolvidos às suas caixas.

Após 2-4 horas de recuperação e período de alimentação, os filhotes foram colocados dentro de uma câmara feita de acrílico transparente (1500mL) e expostos a ambiente a 8% de oxigênio-92% nitrogênio (White Martins[®]) liberado a 5l/min por 2 horas. A câmara permaneceu imersa parcialmente em água morna (36 - 37°C) para manter a temperatura constante dentro dos limites fisiológicos. Um medidor de oxigênio do ar (MO-890) foi conectado à câmara para monitorar as concentrações no interior do recipiente (Figura II-1B).

O grupo *sham* foi constituído de animais controles que foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, com exceção da ligadura da artéria carótida e da exposição a ambiente hipóxico.

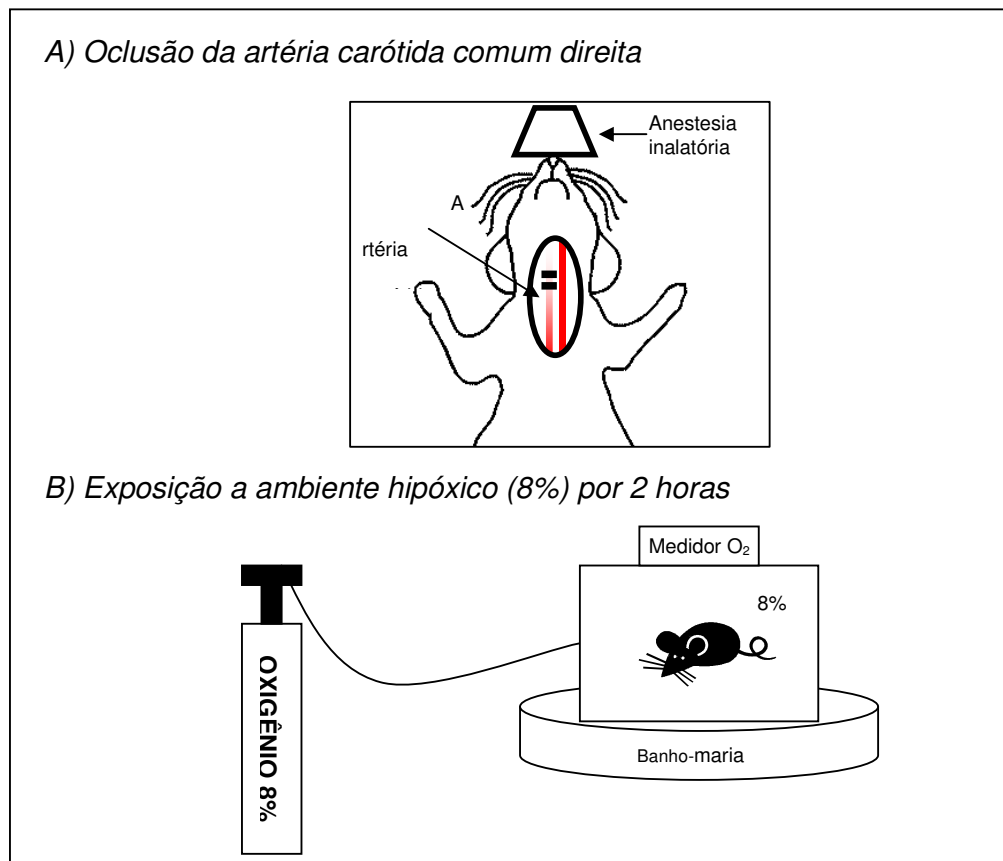


Figura II-1: Etapas da indução da lesão hipóxico-isquêmica.

2.2.2 Avaliação da memória espacial: labirinto aquático de Morris

O labirinto aquático de Morris foi descrito há 20 anos para avaliar o aprendizado e a memória de orientação espacial em roedores e é a principal ferramenta da neurociência comportamental.⁸ Nesta tarefa o animal aprende a localizar uma plataforma submersa numa piscina utilizando, para isso, dicas espaciais distribuídas na sala de treino.

Ao completar 30 dias de vida (aproximadamente três semanas após a indução da hipóxia-isquemia), os animais iniciaram os treinamentos em uma piscina circular preta (120 cm de diâmetro x 60 cm de altura) com 25 cm de água a 21-24°C conforme previamente descrito.^{9,10} A piscina foi dividida virtualmente por quatro quadrantes e a plataforma de resgate de 8 cm de diâmetro ficou localizada no centro de um desses quadrantes, fixada a 1 cm do nível da água.

Dicas espaciais sob a forma de cartazes com padrões geométricos foram fixadas nas paredes em torno da piscina e estavam visíveis ao animal em qualquer ponto. A sala apresentou iluminação indireta sobre o tanque e as pistas distais nas paredes (Figura II-2).

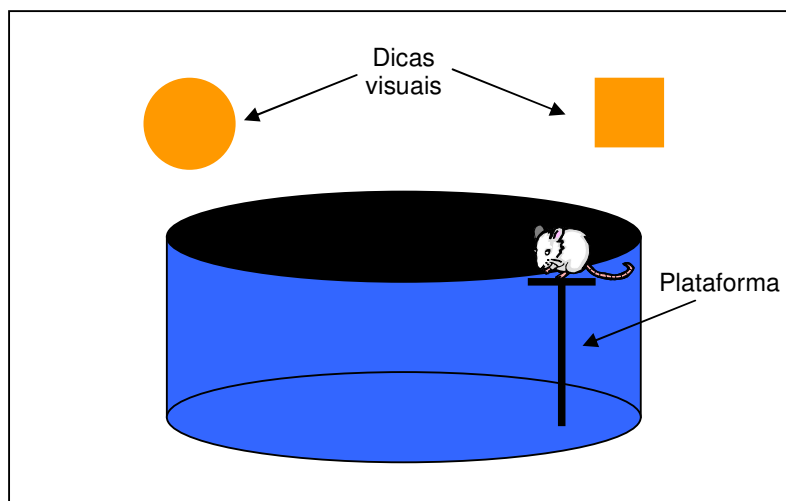


Figura II-2: Labirinto aquático de Morris.

Foram realizados 4 treinos diários com teto de 60 segundos durante 5 dias. O intervalo entre as tentativas consistiu de 30 segundos, tempo em que o animal permaneceu na plataforma. Caso o rato não fosse capaz de encontrar a plataforma no tempo previsto, a pesquisadora conduzia-o gentilmente até o alvo, aguardava 30 segundos e registrava uma latência de 60 segundos. Em cada tentativa, o animal foi colocado no tanque de uma posição cardinal diferente, sinalizada na borda (norte, sul, leste ou oeste) com o focinho voltado para a parede da piscina. Durante os treinamentos foi registrado o tempo gasto por cada animal em cada treino para atingir a plataforma (latência de escape diária).

No dia do teste (6º dia), a plataforma foi retirada da piscina e os animais foram colocados no tanque no ponto mais distante onde se encontrava a plataforma. Através de um *software* especializado, os seguintes parâmetros foram analisados por um avaliador cego: o tempo gasto na zona onde estava a plataforma (tempo no quadrante alvo) e o tempo gasto para atingir o local onde estava a plataforma durante os treinamentos (latência de escape).

2.2.3 Avaliação histológica

Após o término das avaliações comportamentais, os grupos do estudo foram destinados à perfusão transcardíaca para posterior avaliação histológica. Os animais foram anestesiados com tiopental sódico intraperitoneal (0,1ml/100g de peso corporal) e, após, realizou-se a toracotomia e a exposição do coração. No ventrículo esquerdo, injetou-se heparina (0,1ml/100g de peso corporal) e realizou-se uma

incisão para a fixação de uma cânula de perfusão conectada a uma bomba de perfusão (Gilson[®]). No átrio direito também foi realizada uma incisão, porém sem a colocação de uma cânula. Inicialmente foram perfundidos 150ml de solução salina e, posteriormente, 300ml de solução fixadora de paraformaldeído (PFA) 4% diluído em tampão fosfato (pH = 7,4). Em seguida, os encéfalos foram cuidadosamente retirados e a avaliação macroscópica foi realizada por inspeção visual. Considerou-se que ratos tiveram lesão hipóxico-isquêmica na presença de infarto cístico ou redução do volume do hemisfério ipsilateral à oclusão da artéria carótida. O cerebelo e o tronco encefálico foram excluídos das análises.

Após esta avaliação, os encéfalos foram pós-fixados por 24 h em PFA 4%, crioprotetidos em sacarose 30% (pH 7,4) por 24 h, congelados em nitrogênio líquido e isopentano e armazenados a -80°C.

Transcorrido o tempo de pós-fixação, fatias de 35µm em corte coronal foram obtidas usando um criostato (*Shandon*[®]). Os cortes foram, então, colocados em lâminas histológicas e submetidos à técnica histológica de Nissl. Para a técnica de Nissl, os cortes foram hidratados, colocados em uma solução de violeta de cresila por 30s e cobertos com lamínulas. Avaliações qualitativas com o uso do microscópio (*Olympus BX40*) foram realizadas no estudo piloto, observando o tamanho do hemisfério e a presença de lesões císticas.

2.3 Fase II: uso de células-tronco em modelo experimental de hipóxia-isquemia neonatal

2.3.1 Grupos experimentais

Ao completar 7 dias de vida, quatro ninhadas foram submetidas à indução da hipóxia-isquemia perinatal conforme descrição do item 2.2.1. Após 24h, as ninhadas foram randomizadas em dois grupos de estudo: o grupo tratado com células-tronco (HI + CT) e o grupo tratado com solução salina (HI + salina). Com o objetivo de amenizar uma possível perda amostral excessiva devido ao tratamento com as células-tronco humanas, ninhadas constituídas de números ímpares de animais foram divididas em grupos desiguais, sorteando um animal a mais ao grupo HI + CT. Imunossupressores não foram administrados nos animais do estudo.

O grupo HI + CT (n=15) foi formado de ratos que receberam a injeção de células-tronco de cordão umbilical humano 24 horas após a lesão por via endovenosa. O grupo HI + salina (n = 10) foi submetido ao mesmo procedimento, porém os animais foram tratados com solução salina. Um grupo de 9 animais cirurgia-simulada (*sham*) constituído de ratos submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, com exceção da ligadura da artéria carótida e da exposição a ambiente hipóxico foi adicionado ao estudo.

Ao completar 30 dias de vida (aproximadamente 3 semanas após a randomização), os animais iniciaram os testes comportamentais e, após, foram sacrificados para a realização das avaliações histológicas.

2.3.2 Obtenção, preparo e administração das células-tronco de cordão umbilical humano

As células-tronco foram obtidas a partir de sangue de cordão umbilical humano de recém-nascidos do Centro Obstétrico do Hospital São Lucas da PUC-RS. Os critérios de inclusão para a seleção das mães doadoras voluntárias foram a concordância na participação do estudo (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido em anexo), idade entre 18 e 36 anos e pré-natal documentado. Foram excluídas gestantes com histórico de uso de drogas, doenças infecto-contagiosas, doenças que possam interferir na vitalidade da placenta (diabetes mellitus, hipertensão arterial, entre outras), tempo de bolsa rota maior que 18 horas e prematuridade (idade gestacional < 32 semanas).

O sangue de cordão umbilical e placentário foi coletado das veias umbilicais logo após o parto (coleta extra-útero), através da utilização de seringas esterilizadas e heparinizadas. O material coletado foi mantido em temperatura ambiente no período máximo de 24 horas até o preparo das células-tronco.

Para a separação das células-tronco, o sangue obtido do cordão umbilical humano foi diluído em meio RPMI 1640 (1:1) (*Gibco*, EUA). Esta suspensão foi fracionada em um gradiente de densidade gerado por centrifugação sobre Histopaque® 1,077g/L (*Sigma-Aldrich*, EUA) a 400 g durante 30 minutos a 25° C. A fração mononuclear situada sobre a interface com o Histopaque® foi coletada e lavada duas vezes com DPBS contendo 1% de Liquemine® (*Roche*, Suíça). A

viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão com Trypan Blue Stain 0,4% (Gibco, EUA).

A administração das células-tronco nos ratos selecionados foi realizada 24 h após a indução da lesão, via intravenosa (veia jugular externa). Para isso, os animais foram anestesiados com halotano e a sutura previamente realizada foi desfeita. A veia jugular externa foi dissecada e, com o uso de um fio de sutura seda 7.0, a porção mais cranial da veia jugular externa foi ligada a fim de reduzir a quantidade de sangramento após a punção venosa.

A injeção das células-tronco foi realizada através de uma micropipeta de vidro com ponta ultra-fina (diâmetro < 5 μm), preparada com o uso de um estirador de micropipetas MP-87 (*Sutter Instrument Company, CA*). A micropipeta foi conectada a um tubo de silicone e a uma seringa de insulina, com 1×10^7 células em um volume de 100 μL de DPBS (Figura II-3A). Assim que o refluxo sangüíneo foi percebido no sistema (Figura II-3B), considerou-se que o mesmo estava adequadamente posicionado no leito vascular. Seguidamente, uma pressão positiva foi lentamente aplicada à seringa para que a solução progredisse vagarosamente. Ao término do conteúdo da seringa, a pipeta foi retirada e, rapidamente, uma microtorunda de algodão foi posicionada no local, com o objetivo de tamponar qualquer sangramento adicional. Após a revisão da adequada hemostasia, foi realizada uma nova sutura da pele com fio de seda 7.0. O mesmo procedimento foi realizado nos animais selecionados para o grupo salina.

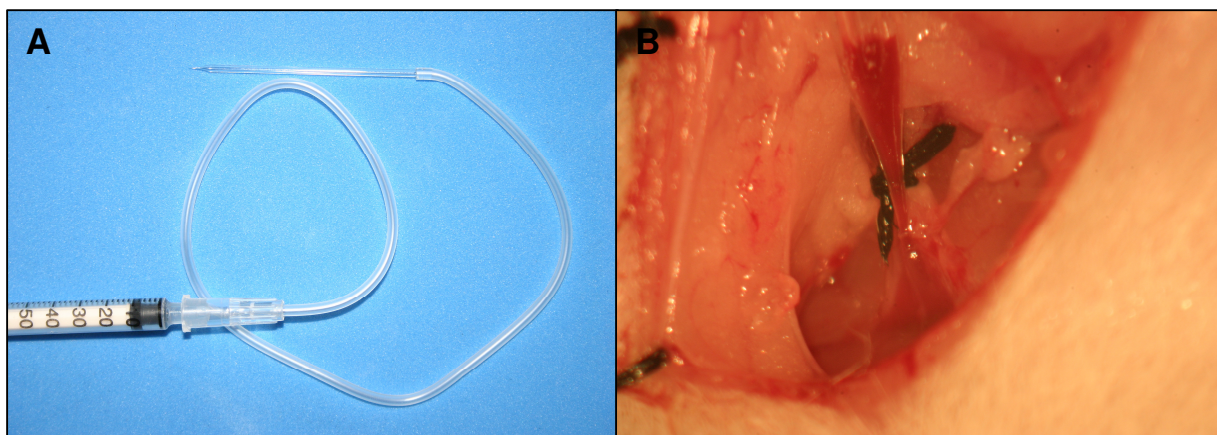


Figura II-3: Método de administração intravenosa. A. Micropipeta conectada à seringa. B. Punção da veia jugular externa utilizando a micropipeta. Aumento 40x.

2.3.3 Avaliação da memória espacial: labirinto aquático de Morris

Os animais dos três grupos do estudo foram destinados às avaliações da memória de orientação espacial no labirinto aquático de Morris, aos 30 dias de vida, conforme descrição no item 2.2.2. Todas as análises foram realizadas por um avaliador cego.

2.3.4 Experimento adicional: avaliação das funções neuromotoras

Após os resultados do teste comportamental, observou-se a necessidade de avaliar a influência de possíveis déficits motores nos resultados do labirinto aquático de Morris. Para isso, dois novos grupos de animais foram randomizados em HI + CT (n=11) ou HI + salina (n=12), provenientes de 4 ninhadas distintas. Oito animais cirurgia-simulada provenientes de uma única ninhada foram incluídos para o grupo de animais saudáveis. O diagrama da Figura II-4 resume as etapas do estudo nos grupos de avaliação motora e do labirinto aquático de Morris.

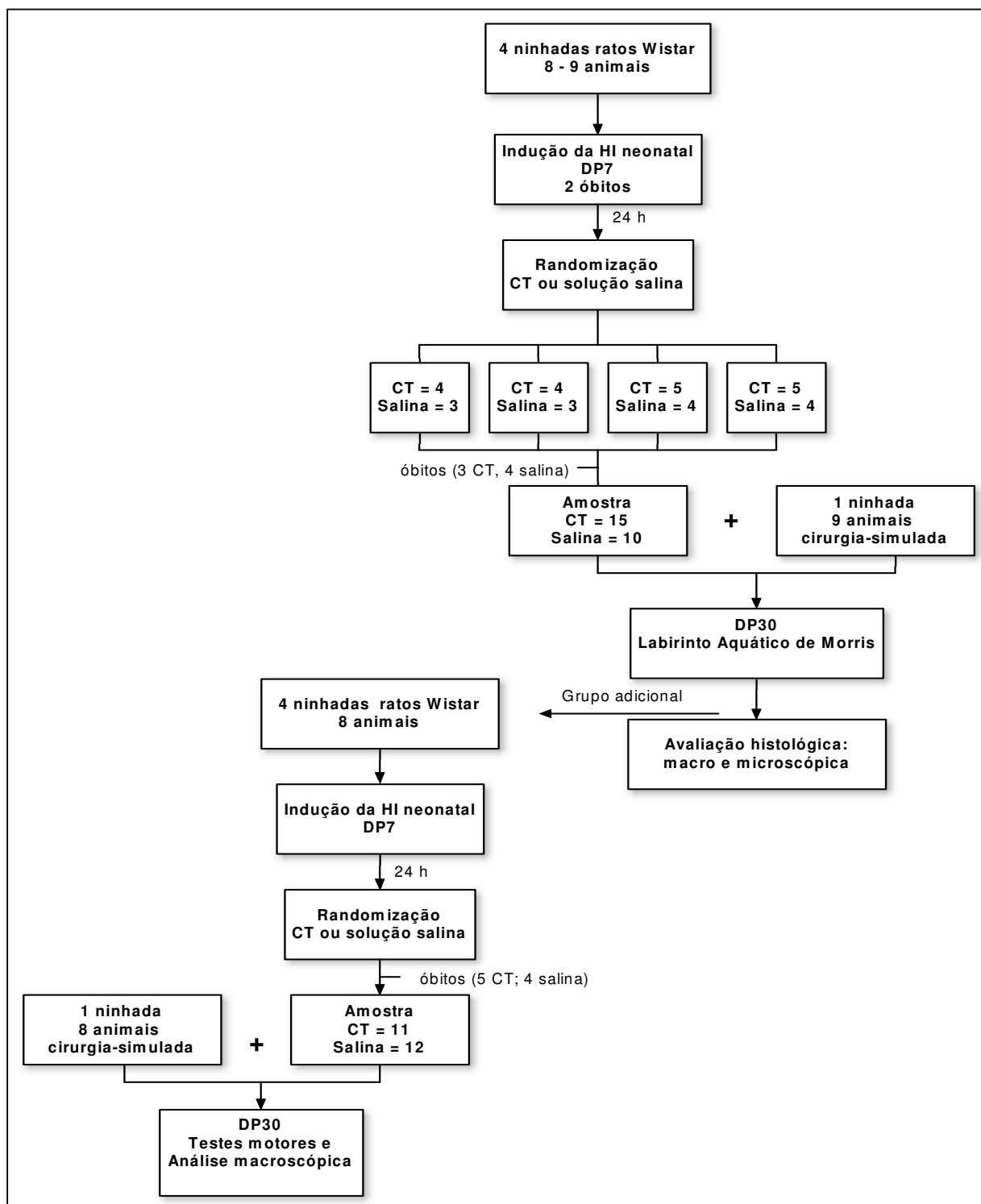


Figura II-4: Diagrama das etapas do estudo.

As avaliações neuromotoras foram realizadas aos 30 dias de vida (3 semanas após a randomização) por um avaliador cego e constituíram-se de quatro testes: exploração no campo aberto, teste do cilindro, teste da caminhada na grade (*grid walking*) e o teste da trave (*tapered beam walking test*), baseados em estudos prévios em modelos animais de isquemia em roedores neonatos e adultos.

A atividade locomotora e o comportamento exploratório foram avaliados através da tarefa comportamental Campo Aberto (*Open Field*). O aparato dessa avaliação constituiu-se de uma caixa de madeira compensada com dimensões de 40 x 30 cm, circundada por paredes altas de 50 cm e uma parede frontal de vidro transparente, possibilitando a observação do avaliador (Figura II-5). O assoalho do campo aberto foi dividido em 12 áreas iguais por linhas pretas.

Os animais foram colocados na sala de experimentação 20 minutos antes do teste para aclimatização. O experimento foi realizado em uma sala silenciosa e com pouca iluminação. Durante o experimento, cada rato foi gentilmente colocado dentro da caixa, de frente para a parede posterior, permanecendo no interior do aparato para livre exploração por 5 minutos. As variáveis registradas foram o tempo de locomoção, o número de cruzamentos nas linhas pretas e o comportamento de *rearing*, ou seja, o número de vezes em que o animal se colocou no plano vertical, apoiando-se somente sobre as patas traseiras para exploração do ambiente.^{11,12}



Figura II-5: Exploração no campo aberto.

O teste do cilindro, desenvolvido por Schallert et al.¹³ foi utilizado para avaliar a assimetria das patas anteriores durante a exploração vertical em um cilindro transparente. O aparato constitui-se de um cilindro transparente de 15 cm de diâmetro e 30 cm de altura. Cada animal foi colocado individualmente no cilindro e vídeo-monitorado por 5 min. Os seguintes comportamentos foram registrados: 1) uso independente (número de contatos) do membro anterior esquerdo ou direito para contatar a parede do cilindro durante a elevação (Figura II-6A), e 2) uso simultâneo (número de contatos) das patas anteriores para contatar a parede do cilindro durante a elevação e nos movimentos laterais (Figura II-6B).

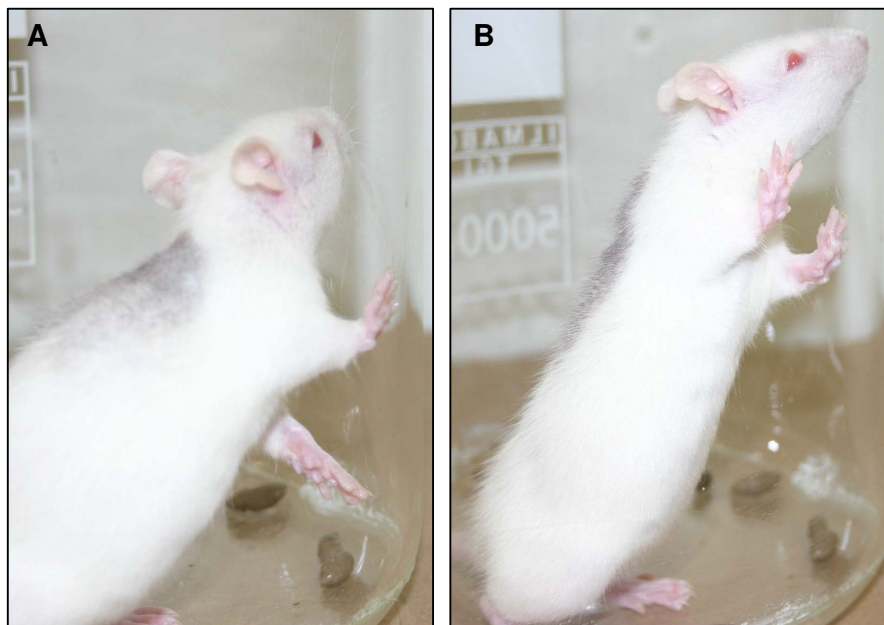


Figura II-6: Teste do cilindro. A. Movimento independente da pata anterior direita. B. Movimento simultâneo das patas anteriores.

Os resultados foram calculados pelo percentual do uso da pata anterior não-prejudicada (ipsilateral, direita) em relação ao número total de movimentos e o percentual do uso da pata anterior prejudicada (contralateral, esquerda) em relação ao número total de movimentos. O escore de assimetria foi dado como a diferença entre o percentual do uso da pata anterior não-prejudicada (direita), do percentual do uso da pata anterior prejudicada (esquerda) para a exploração. Animais com menos de 10 movimentos foram excluídos da análise.¹⁴⁻¹⁶

O teste da caminhada na grade (Figura II-7) mede a habilidade do animal de integrar as respostas motoras. A precisão e a colocação correta das patas são requeridas para completar o teste com sucesso. Os animais foram colocados em uma grade de arame (35 x 45 cm, com aberturas de 4 cm²) suspensa a 100 cm do

solo. Durante o período de observação de 1 min, o número de passos e o número de deslizes das patas posteriores, ou seja, o número de erros para alcançar a grade (quando a pata passou por entre o espaço vazio da grade) foi registrado através de vídeo-monitoramento. O resultado foi dado como o escore de deslize, calculando-se o percentual do número de deslizes em relação ao número de passos dados.^{12,17}



Figura II-7: Deslize no teste da caminhada na grade.

O teste da trave foi desenvolvido para avaliar a coordenação e o equilíbrio em roedores através de medida do número de deslizes do animal ao atravessar uma trave de madeira para alcançar uma caixa escura.¹⁸ O aparato do teste constituiu-se de uma trave de madeira afilada (140 cm de comprimento, 6 cm de largura no início e 1,5 cm ao final), com bordas laterais de 1,5 cm cada lado, para permitir deslizes sem quedas. Ao final da trave foi colocada uma caixa preta (22 x 30 x 26 cm). Um estímulo luminoso foi colocado acima do ponto inicial da trave para motivar o rato a atravessar a trave. Os ratos foram pré-treinados na trave por três dias antes do teste, através de três tentativas diárias, com intervalos de 1 minuto.

No dia do teste, o desempenho do animal foi vídeo-monitorado e o número de passos, o número de deslizes na superfície vertical (Figura II-8A) e o número de deslizes na superfície horizontal (Figura II-8B) dos membros posteriores foram contados. O escore de deslize foi dado como: $[(\text{deslizes verticais} \times 0,5 + \text{deslizes horizontais}) / (\text{passos} + \text{deslizes verticais} + \text{deslizes horizontais})] \times 100$. O escore final foi representado como a média de três tentativas para atravessar a trave no dia do teste.¹⁹⁻²¹

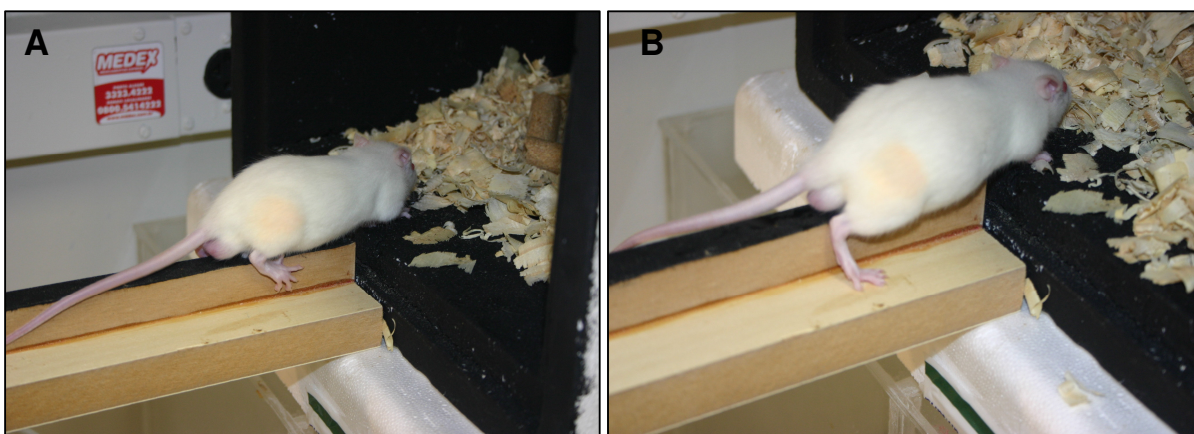


Figura II-8: Teste da trave. A. Deslize vertical. B. Deslize horizontal.

2.3.5 Avaliação histológica

Após a avaliação no labirinto aquático de Morris e dos testes motores, os animais foram perfundidos e, imediatamente após a dissecação dos encéfalos, foi realizada a análise macroscópica por inspeção visual. Os procedimentos de fixação, congelamento e avaliação da presença de lesão cística são descritos no item 2.2.3.

Secções coronais de 50 μ m de espessura foram obtidas de toda a extensão do encéfalo (exceto cerebelo) usando um criostato (*Shandon*[®]), com intervalos de

250µm entre as fatias adquiridas. Os cortes obtidos foram colocados em lâminas histológicas preparadas com poly-L-lysina e submetidos à técnica histológica de Nissl.

As imagens das lâminas histológicas foram capturadas por uma câmera digital acoplada em microscópio *Olympus BX40* e a um microcomputador com um *software* de análise de imagens (*Image-Pro Plus 6.1, Media Cybernetics, Silver Spring, EUA*).

A estimativa do volume dos hemisférios foi obtida pelo princípio de Cavalieri através de dois modos distintos:^{22,23} (a) pelo delineamento do hemisfério (Figura II-9A) com auxílio do cursor; e (b) pela contagem de pontos (Figura II-9B), que consistiu na sobreposição de uma grade de pontos sobre a imagem digitalizada, em que cada ponto representou 0,597 mm² (área ponto). Foram contados todos os pontos que se sobrepunham ao hemisfério. Com o objetivo de evitar a superestimação ou a subestimação do volume, dentre os quatro ângulos dos pontos, considerou-se apenas o ângulo superior direito. As delimitações anatômicas dos hemisférios foram realizadas com o auxílio de um atlas estereotáxico.²⁴

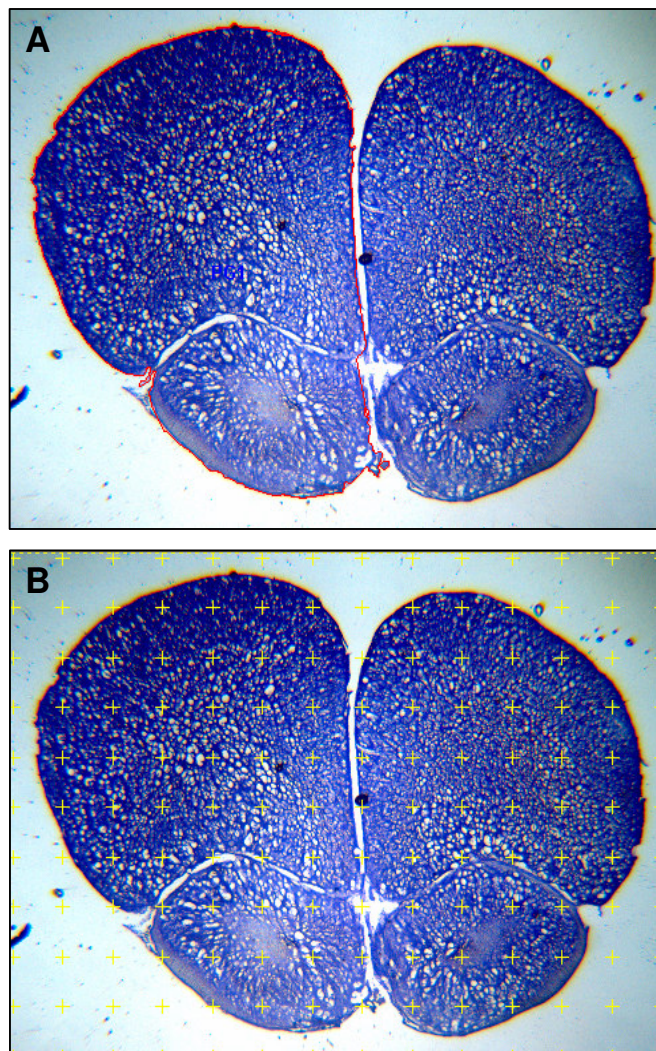


Figura II-9: Métodos para estimativa do volume do hemisfério. A. Método de delineamento. B. Método de contagem de pontos.

A estimativa final do volume dos hemisférios (mm^3) foi obtida pelas seguintes equações:

Método de delineamento: $V(\text{est}) = (A_1.T) + (A_2.T)...$, em que, $V(\text{est})$ = estimativa do volume; A = área obtida pelo delineamento do hemisfério; T = distância entre as secções analisadas.

Método de pontos: $V(\text{est}) = \Sigma P.(A/P).T$, em que, $V(\text{est})$ = estimativa do volume; ΣP = soma dos pontos; A/P = área ponto (0,597 mm²); T = distância entre as secções analisadas.

2.4 Análise estatística

Para a comparação entre as médias das variáveis cognitivas, motoras e histológicas utilizou-se a análise de variância de uma via (ANOVA) ou teste de Kruskal-Wallis, conforme distribuição das variáveis, seguido do teste de Tukey ou Dunns, respectivamente. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão para variáveis de distribuição normal. Para variáveis de distribuição anormal, utilizou-se a mediana e o intervalo interquartil de 25 a 75%. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. As análises estatísticas foram realizadas através de *software* estatístico SPSS versão 15.0.

2.5 Cálculo amostral

O cálculo do tamanho da amostra foi baseado nos resultados do labirinto aquático de Morris na fase I (piloto). Considerando um valor de $p < 0,05$ e com um

poder de 90% para estimar uma diferença de 40% entre os grupos, calculou-se um número amostral de, aproximadamente, 10 animais por grupo.

2.6 Aspectos éticos

No presente estudo, os protocolos experimentais utilizados seguiram as normas internacionais de experimentação com animais de laboratório. Todos os procedimentos foram realizados, tomando os cuidados necessários para reduzir ao máximo o número de animais empregados. Os animais receberam cuidados adequados, foram submetidos ao mínimo possível de desconforto e “stress”. Durante os procedimentos foram instituídas sedação e analgesia de acordo com a prática veterinária aceita.

O uso de células-tronco de cordão umbilical humano em modelos animais tem sido amplamente estudado.²⁵⁻²⁹ Nessa pesquisa, a coleta do sangue de cordão umbilical e placentário não acarretou riscos para a doadora e qualquer impedimento para este procedimento foi respeitado pela pesquisadora.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUC-RS, registro CEP 06/030362, em 17 de julho de 2006.

2.7 Referências bibliográficas

- 1 Levine S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol* 1960;36:1-17.
-

- 2 Raju T. Some animal models for the study of perinatal asphyxia. *Biol Neonate* 1992;62:202-214.
 - 3 Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* 1981;9:131-141.
 - 4 Vannucci RC, Vannucci SJ. A model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Ann N Y Acad Sci* 1997;835:234-249.
 - 5 Vannucci RC, Vannucci SJ. Perinatal hypoxic-ischemic brain damage: evolution of an animal model. *Dev Neurosci* 2005;27:81-86.
 - 6 Yager JY. Animal models of hypoxic-ischemic brain damage in the newborn. *Semin Pediatr Neurol* 2004;11:31-46.
 - 7 Vannucci RC, Connor JR, Mauger DT, Palmer C, Smith MB, Towfighi J, et al. Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *J Neurosci Res* 1999;55:158-163.
 - 8 Morris R. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn Motiv* 1981;12:239-260.
 - 9 Rossato JI, Bevilaqua LR, Myskiw JC, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Learn Mem* 2007;14:36-46.
 - 10 Kumral A, Uysal N, Tugyan K, Sonmez A, Yilmaz O, Gokmen N, et al. Erythropoietin improves long-term spatial memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Behav Brain Res* 2004;153:77-86.
 - 11 Izquierdo LA, Barros DM, Medina JH, Izquierdo I. Stress hormones enhance retrieval of fear conditioning acquired either one day or many months before. *Behav Pharmacol* 2002;13:203-213.
 - 12 Lubics A, Reglodi D, Tamas A, Kiss P, Szalai M, Szalontay L, et al. Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury. *Behav Brain Res* 2005;157:157-165.
 - 13 Schallert T, Fleming SM, Leasure JL, Tillerson JL, Bland ST. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology* 2000;39:777-787.
 - 14 Chang YS, Mu D, Wendland M, Sheldon RA, Vexler ZS, McQuillen PS, et al. Erythropoietin improves functional and histological outcome in neonatal stroke. *Pediatr Res* 2005;58:106-111.
 - 15 Gustavsson M, Anderson MF, Mallard C, Hagberg H. Hypoxic preconditioning confers long-term reduction of brain injury and improvement of neurological ability in immature rats. *Pediatr Res* 2005;57:305-309.
 - 16 Gulley JM. Individual differences in novelty- and cocaine-induced locomotor activity as predictors of food-reinforced operant behavior in two outbred rat strains. *Pharmacol Biochem Behav* 2007.
 - 17 Modo M, Stroemer RP, Tang E, Veizovic T, Sowniski P, Hodges H. Neurological sequelae and long-term behavioural assessment of rats with transient middle cerebral artery occlusion. *J Neurosci Methods* 2000;104:99-109.
 - 18 Fujimoto ST, Longhi L, Saatman KE, Conte V, Stocchetti N, McIntosh TK. Motor and cognitive function evaluation following experimental traumatic brain injury. *Neurosci Biobehav Rev* 2004;28:365-378.
-

- 19 Karhunen H, Nissinen J, Sivenius J, Jolkkonen J, Pitkanen A. A long-term video-EEG and behavioral follow-up after endothelin-1 induced middle cerebral artery occlusion in rats. *Epilepsy Res* 2006;72:25-38.
 - 20 Schallert T, MT W. *The Behavior of the Laboratory Rat. A Handbook with Tests.* New York: Oxford University Press; 2005.
 - 21 Zhao CS, Puurunen K, Schallert T, Sivenius J, Jolkkonen J. Behavioral effects of photothrombotic ischemic cortical injury in aged rats treated with the sedative-hypnotic GABAergic drug zopiclone. *Behav Brain Res* 2005;160:260-266.
 - 22 Avendano C, Roda JM, Carceller F, Diez-Tejedor E. Morphometric study of focal cerebral ischemia in rats: a stereological evaluation. *Brain Res* 1995;673:83-92.
 - 23 Rodrigues AL, Arteni NS, Abel C, Zylbersztejn D, Chazan R, Viola G, et al. Tactile stimulation and maternal separation prevent hippocampal damage in rats submitted to neonatal hypoxia-ischemia. *Brain Res* 2004;1002:94-99.
 - 24 Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Sydney: Academic Press; 1986.
 - 25 Borlongan CV, Hadman M, Sanberg CD, Sanberg PR. Central nervous system entry of peripherally injected umbilical cord blood cells is not required for neuroprotection in stroke. *Stroke* 2004;35:2385-2389.
 - 26 Chen J, Sanberg PR, Li Y, Wang L, Lu M, Willing AE, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke* 2001;32:2682-2688.
 - 27 Chen N, Hudson JE, Walczak P, Misiuta I, Garbuzova-Davis S, Jiang L, et al. Human umbilical cord blood progenitors: the potential of these hematopoietic cells to become neural. *Stem Cells* 2005;23:1560-1570.
 - 28 Meier C, Middelanis J, Wasielewski B, Neuhoff S, Roth-Haerer A, Gantert M, et al. Spastic paresis after perinatal brain damage in rats is reduced by human cord blood mononuclear cells. *Pediatr Res* 2006;59:244-249.
 - 29 Sanberg PR, Willing AE, Garbuzova-Davis S, Saporta S, Liu G, Sanberg CD, et al. Umbilical cord blood-derived stem cells and brain repair. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1049:67-83.
-



CAPÍTULO III





Artigo Original



Cord blood cells in neonatal hypoxia-ischemia

Infusion of Human Umbilical Cord Blood Cells in a Rat Model of Neonatal Hypoxia-ischemia

Authors:

Simone de Paula

Jaderson Costa da Costa

Humberto Holmer Fiori

Affonso Santos Vitola

Davi de Paula

Samuel Greggio

Pamela Billig Mello

Jeremiah Mistrello Lubianca

Tiago Giuliani Lopes

Léder Leal Xavier

Neuroscience Laboratory, Biomedical Research Institute, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, *Porto Alegre, RS, BRAZIL*

Corresponding author

Jaderson Costa da Costa

Address: Neuroscience Laboratory, Biomedical Research Institute, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga 6690/220, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil. Tel./fax: + 51 33203312.

E-mail: jcc@pucrs.br

Key-words: umbilical cord blood, stem cells, hypoxic-ischemic brain injury, asphyxia, animal models.

ABSTRACT

Hypoxic-ischemic injury is an important cause of mortality and morbidity in infants, often leading to mental retardation, epilepsy and cerebral palsy. Human umbilical cord blood (HUCB), which is rich in adult stem cells, is a potential source of cellular therapy in perinatology. In this study, we investigated the effects of HUCB cells on motor, spatial orientation memory and histological outcome in neonate rats subjected to hypoxic-ischemic (HI) injury. Seven-days-old rats underwent right carotid artery occlusion followed by exposure to 8% O₂ inhalation for 2 h. Twenty-four hours after HI injury, rats received either saline solution or HUCB cells intravenously. We also added a group of sham-operated animals. After three weeks, spatial orientation memory was assessed using Morris Water Maze and motor evaluations were conducted by open-field activity, cylinder, grid walking and ledged beam walking tests. Subsequently, rats were sacrificed for histological analyses. HI rats showed a significant spatial orientation memory deficit and a volumetric decrease of the ipsilateral hemisphere to arterial occlusion. However, animals that received HUCB cells did not show statistical difference in behavioral tests and cerebral atrophy when compared to saline group. The present study suggests that, according to our experimental design, intravenous injection of HUCB cell does not improve functional and histological outcomes in HI rats with severe brain damage.

INTRODUCTION

Neonatal hypoxia-ischemia is a major cause of mortality and morbidity in infants and occurs in about 2-4 per 1,000 full-term births. Between 20-50% of asphyxiated newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy die within the newborn period, and up to 25% of the survivors will exhibit neurodevelopment morbidity, such as cerebral palsy, mental retardation, epilepsy and learning disabilities. Despite the severe clinical and socioeconomic significance, current management to successfully restore deficits in cellular and neurological function caused by perinatal brain insults has been limited [1-4].

Regenerative biological approaches utilizing stem cells have been applied in several targets that used to be considered incapable of self-regeneration such as the heart and the brain. Studies in animal models of human neurological diseases have resulted in functional improvement by adult stem cell transplantation. However, therapeutic potential of stem cells in neonatal brain damage is still unclear [5-11].

Human umbilical cord blood (HUCB), is rich in adult stem cells and is one potential source for transplantation, especially for perinatal neuronal repair. When compared with bone marrow, HUCB contains higher numbers of hematopoietic stem cells and they have a higher proliferative potential [12]. Studies have showed behavioral and neurological recovery in animals with stroke [13-16] and with hypoxic-ischemic insults [17] that received intravenous injection HUCB. However,

mechanisms of cognitive and motor recovery after stem cells transplantation in perinatal hypoxia-ischemia are poorly understood.

The aim of the present study was to assess effects of HUCB cells on spatial orientation memory, motor performance and histological outcome in rats following neonatal hypoxic-ischemic injury.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Ten pregnant Wistar rats from the *Fundação Nacional de Pesquisa e Produção em Saúde* were used in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals adopted by the National Institute of Health (USA). After normal delivery, the litter size was adjusted from 8 to 9 pups per litter. Pups were weaned at 21 days-old. We stipulated the birth day of the rats as day zero.

Neonatal hypoxia-ischemia model

We used the Levine rat model, modified as it was by Rice et al. [18] to neonatal rats. On postnatal day 7 (weight ranging from 12 to 15g) each animal was briefly anesthetized with halothane with use of a face mask. The right common carotid artery was identified through a midline longitudinal neck incision, isolated from the vagus nerve and internal jugular vein and permanently occluded in two different

points (distant 4 mm one from another) with 7.0 surgical silk suture. The entire surgical procedure was completed within 15 min.

After the wound was sutured, animals were put back into their cages and allowed to recover for 2-4 hours in company of their mother. Rats were then placed for 2h in a hypoxia chamber, with constant flow of humidified 8% oxygen balanced with nitrogen. The hypoxia chamber was kept in a water bath to maintain the ambient temperature inside the chamber at a normal range (37–38°C). Following hypoxic exposure, the pups were returned to their mother for recovery.

Human umbilical cord blood cells separation procedure and administration

Cord blood collections were obtained *ex utero* using sterile syringes containing anticoagulant, immediately after full-term human deliveries. All samples (n=4) were collected after obtaining written informed consent.

Blood samples were then transported at ambient temperature to the laboratory and then, isolated and processed within a range of 24 hours after collection. HUCB was diluted with RPMI medium 1640 (1:1) (Gibco, USA). This suspension was fractionated on a density gradient generated by centrifugation over a 1.077g/L Histopaque® solution (Sigma-Aldrich, USA) at 400 g for 30 minutes at room temperature. The mononuclear fraction situated over the Histopaque® interface was

collected and rinsed twice with DPBS containing 1 % of Liquemine® (Roche, Swiss). The cell viability was evaluated by Trypan Blue Stain 0.4% (Gibco, USA) exclusion method. CD 34+ cells represented in average 0.05% of cord blood mononuclear cells after flow cytometric analysis.

Twenty four hours after hypoxia-ischemia, randomly selected rats received either HUCB cells or saline solution, both intravenously. Animals were anesthetized with halothane, the neck suture was open and left external jugular vein was isolated and distally occluded with a 7.0 surgical silk suture to prevent excessive bleeding. Using a glass micropipette (Sutter Instruments Company, CA) with ultra-fine tip (diameter < 5µm) connected to an insulin syringe, we injected 1×10^7 cells suspended in 100µL total fluid volume into the external jugular vein. Immunosuppressants were not used in any animal.

Experimental groups

Randomization was performed in the treatment day (24h after hypoxia-ischemia). Animals were assigned in two experimental groups to receive either saline or HUCB cells. With the objective of avoiding a possible excessive loss of sample due to the treatment with human stem cells, litters constituted of odd numbers of animals were divided in unequal groups, allocating one more animal to the treated group (HUCB cells). We also added a group of sham-operated animals. Sham-operated animals were anesthetized with halothane, a midline incision was made in

the neck, the common carotid artery was isolated, the incision was sutured and they were later placed in a chamber open to room air during a period of time equivalent to the hypoxic group animals (2h). The spatial orientation memory was analyzed three weeks after hypoxic-ischemic lesion and the histological analyses were performed after the end of behavioral tests. After the results of behavioral tests, we decided to assess the influence of possible motor deficits on Morris Water task performance. For this, we added a new set of three study groups: HUCB cells, saline and sham-operated groups. These groups were subjected to the same methods of study. All evaluations were performed by a blind investigator.

Morris Water Maze test

The spatial orientation memory performance was evaluated using a Morris Water Maze (MWM) as previously described [19, 20]. The water maze consists on a black circular pool (120 cm in diameter) conceptually divided in four equal imaginary quadrants. The water temperature was 21–24°C. Two centimeters beneath the surface of the water and hidden from the rat's view was a black circular platform (8 cm in diameter). It had a rough surface, which allowed rats to climb easily onto it. The water maze was located in a well-lit white room with several posters and other distal visual stimuli hanging on the walls to provide spatial cues.

Training in the hidden platform (spatial) version of the MWM was carried out during five consecutive days. On each day, rats received four consecutive training

trials in which the hidden platform was kept in a constant location. The mean latency of finding the platform was measured for individual animals on each day.

A different starting location was used on each trial, which consisted of a swim followed by a 30-sec platform sit. Rats that did not find the platform within 60 sec were guided to it by the experimenter and their escape latency was recorded as 60 sec.

To assess long-term memory, 24h after the final trial, the platform was removed from the maze. In this probe trial, each rat was placed into the water as in the training trial and time in seconds spend in the quadrant formerly occupied by the platform (target quadrant) was recorded. During training trials and probe trial, movements of the animal were monitored and recorded with a video camera fixed to the ceiling over the center of the maze.

Motor performance

To assess motor performance of experimental groups, we performed a battery of four tests at the third week after induction of hypoxic-ischemic injury, based in studies of animal models of neurological disease [21-25]. Animals of the additional groups were subjected to the following motor tasks: (a) open-field activity; (b) cylinder test; (c) grid walking test; and (d) tapered/ledged walking test.

Open-field activity

The open-field activity test was used to assess motor and exploratory behavior. After acclimatization to the environment, rats were placed in a 40x30 cm wood box with 50 cm high walls around. The floor was divided into 12 equal squares by black lines. Animals were placed into the box, in front of posterior wall, and left to explore the arena freely for a 5-min period. The following parameters were measured: number of line crossings, the number of rearing and locomotion time.

Cylinder test

Forelimb use was analyzed by videotaping movements of each rat during vertical exploration in a transparent cylinder. The apparatus measured 15 cm in diameter and 30 cm in height. Each animal was individually placed in the cylinder and observed for 5 min. The behavior was scored according to the following criteria: (1) independent use of the left (impaired, contralateral) or right (non-impaired, ipsilateral) forelimb for contacting the wall during a full rear to initiate a weight-shifting movement or to regain center of gravity while moving laterally in a vertical posture and (2) simultaneous use of both left and right forelimbs for contacting the cylinder wall during a full rear and for alternating lateral stepping movements along the wall. Behavior was expressed in terms of percent use of the non-impaired forelimb to the total number of limb use observation for wall movements; and percent use of the impaired forelimb to the total number of limb use observation for wall movements.

Forelimb use asymmetry score was calculated as the percentage non-impaired forelimb use subtracted from the percentage impaired forelimb use.

Grid walking test

The grid walking test measures the animals' ability to integrate motor responses. The rats were placed on a stainless steel grid floor (35 x 45 cm with a mesh size of 4 cm²) elevated 1 m above the floor. For a 1 min observation period, the total number of steps was counted. The number of foot fault errors, when the animal misplaced a hindlimb that it falls through the grid, was also recorded.

Tapered/ledged beam walking test

The tapered/ledged beam walking test evaluates balance and coordination of movement in rats, by measuring the latency and number of footslips of an animal traversing a narrow beam to reach a darkened goal box [21].

The beam-walking apparatus consisted of a tapered wooden beam (140 cm long, 6 cm wide at the start and narrowed to 1.5 cm at the end) with ledges on each side to permit foot faults without falling. The end of the beam was connected to a black box (22 x 30 x 26 cm). A bright light was placed above the start point to motivate the rats to traverse the beam. Rats were trained on three consecutive days (3 trials per day). The rat's performance in the testing day was videotaped and the numbers steps on the upper level, slips to the vertical surface of the beam and slips

to the lower level for hind limbs were counted. The score for each trial was calculated as follows: $[(\text{vertical slips} \times 0,5 + \text{horizontal slips}) / (\text{steps} + \text{vertical slips} + \text{horizontal slips})] \times 100$. The score for the testing day was represented as the mean of three trials to traverse beam.

Morphological study

After completing behavioral test, animals were deeply anesthetized with thiopental sodium (0,1ml/100g, i.p.) and perfused transcardially with saline followed by 4% paraformaldehyde. The brains were removed and stored in the same solution.

Macroscopic assessment was evaluated immediately after dissecting the brain by gross visual inspection on groups of motor and Morris Water Maze evaluations. Neonatal rats were considered to have suffered hypoxic-ischemic brain damage when displaying infarcted area or reduction of volume of hemisphere on the brain surface ipsilateral to the carotid artery occlusion. The brainstem and cerebellum were excluded from the study.

In order to obtain, microscopic assessment, coronal sections 50 μ m thick through the entire extent of the brain (except cerebellum) were cut using a cryostat (Shandon[®]), with 250 μ m intervals, and stained with cresyl violet by the Nissl method. Cross-sectional areas were captured by a video camera installed in an Olympus BX40 microscope, interfaced by a software (Image Pro-Plus 6.1, Media Cybernetics, Silver Spring, USA) run in a personal computer. Images of the hemispheres were

displayed onto a high-resolution video monitor and its boundaries were outlined for area measurement. The boundaries were defined in accordance with Paxinos and Watson atlas [26].

The Cavalieri method was used to determine the estimation volume (mm^3) of hemispheres by summation of areas and by multiplication of between-section distance. Cross-sectional area of hemisphere was obtained outlining edges of each hemisphere. Ventricular space was subtracted from the measurements. Volume estimation was performed in about 10 sections for each rat [27, 28].

Microscopic assessment was performed only on the group of Morris Water Maze test. One sham-operated rat was excluded from the study due to problems with histological processing of the brains.

Statistical analysis

Quantitative variables with normal distribution were presented as means and standard deviations (SD) and the comparison among the groups was analyzed by ANOVA one-way followed by Tukey's test. Otherwise, variables were presented as median and interquartile range 25-75 and we used the Kruskal-Wallis test following Dunn's comparison. Data were considered significantly different if $p < 0.05$ between groups.

RESULTS

In Water Maze test group, two animals died during the carotid artery occlusion and six animals (3 saline group and 3 treated group) died during the injection of HUCB cells or saline solution, due to anesthesia procedures, bleeding or the presence of microbubbles in the transplanted solution (gas embolism). Only one pup (saline group) died one week after procedures of hypoxic-ischemic model and treatment. Therefore, sample size of the study was 15 animals for HUCB cells group, 10 animals for saline group and 9 animals for sham-operated group.

In motor evaluation group, no animal died during the hypoxic-ischemic injury induction and nine animals died during the injection of HUCB cells (n = 5) or saline solution (n=4). Sample size to assess motor function was 11 animals for HUCB cells group, 12 animal for saline group and 8 animals for sham-operated group

HUCB stem cells did not improve spatial orientation memory in rats with hypoxia-ischemia injury

To determine whether transplanted HUCB cells can improve cognitive deficits, the Water Maze test results were compared. With regard to mean daily latency to reach the platform, measures one-way ANOVA revealed significant differences among experimental groups during training period, except in day 1. However, as show in Figure 1A, the mean latency of second to fifth day was shorter only in sham-operated rats when compared with saline and HUCB cells groups. There was no

statistical difference between animals treated with HUCB cells and saline group from the second to the fifth day of training after post hoc analysis by Tukey's test.

Analysis of the probe trials (Figure 1B) also showed that the mean of time spent in target quadrant was significantly different among groups ($p < 0.05$), but this was due to a longer time spent by sham-operated group when compared with saline-group. We observed that there was not difference between sham-operated and HUCB cells group ($p = 0.15$). However, treated rats with HUCB cells spent only 25.5% of swimming time in target quadrant.

In motor performance, rats with hypoxic-ischemic brain damage presented only a tendency to forelimb use asymmetry in cylinder test and to higher number of slips in grid walking test, which were not reduced with HUCB cells injection

Table 1 shows that open-field activity and ledged beam walking tests did not reveal significant differences between HUCB cells, saline and sham-operated groups. In the cylinder test at 4 week of age, non-parametric analysis among three study groups revealed a tendency to forelimb use asymmetry ($p = 0.05$). Two saline group rats were excluded because presented less than 10 movements.

We also observed that HUCB cells, saline and sham-operated groups did not present statistical differences in grid walking test, although there was a tendency ($p = 0.07$) to higher slip score in rats with hypoxia-ischemia. However, post hoc analyses

showed high p values between HUCB cells vs. saline groups in cylinder test ($p = 0.98$) and grid walking test ($p=0.34$).

HUCB cells transplantation did not reduce the hemispheric atrophy following hypoxia-ischemia brain damage

Macroscopic assessment of brains (Figure 2) performed in all groups of study (Water Maze and motor test groups) revealed that 61.5% ($n=16$) of the animals of HUCB cells group presented infarct area in right hemisphere compared to 63.6% in the saline group ($n=14$). There was no significant difference in Chi-square test ($p=0.88$). Behavioral and histological results were not altered by the exclusion of animals without macroscopic injury (data not shown).

Our results of microscopic assessment in animals treated only with saline solution showed that neonatal hypoxic-ischemic lesion caused significant decrease in volume of the hemisphere ipsilateral to carotid occlusion (right) when compared to contralateral hemisphere ($p < 0.001$) and when compared to right hemispheres of sham-operated group ($p < 0.01$) three weeks after injury.

The group that received HUCB cells also presented right hemisphere volume significantly reduced when compared to the left hemisphere ($p<0.01$). However, there was not statistical difference between right hemispheres of HUCB cells group and of

sham-operated group. Differences between treatment groups (HUCB cells vs. saline groups) were not significant either (Figures 3 and 4).

We also assessed the hemisphere volume in three subareas: anterior, middle and posterior third. Data summarized in table 2 showed that the right hemisphere volume was reduced in all analyzed subareas in saline and HUCB groups when compared with contralateral hemisphere. When the right hemisphere of sham-operated rats was compared with right hemisphere of saline group there was a difference in middle and posterior third. In all subareas, we did not find differences between right hemisphere of sham-operated and HUCB cells group. However, comparison of volume of right hemisphere between treatment groups did not show significant differences.

DISCUSSION

The results of the present study showed that neonatal hypoxic-ischemic brain injury induced significant long-term spatial orientation memory deficits and extensive cerebral atrophy in immature rats. However, intravenous administration of HUCB cells did not cause improvement in neither behavioral nor histological outcomes.

Similarly to other investigations, our study showed that, in spite of severe brain damage, motor function tests were less sensitive or not sensitive to detect sensorimotor alterations in all hypoxic-ischemic rats [29-32]. Differently of human

neonates, pups that underwent neonatal hypoxic-ischemic injury did not show obvious postural or locomotor abnormalities. This can be due to a higher plasticity degree of neonatal rat brain when compared to the human brain. In addition, studies have showed that neonate rats with unilateral cerebral ischemia recover significantly better than adult rats [33, 34]. Small sample size also may explain not significant differences in cylinder test and grid walking test.

Studies have been demonstrating that injury in brain regions requested for the process of memory and learning, result in significantly decrease of spatial orientation memory [29, 30, 32]. Our results showed that Morris Water Maze test was sensitive to the brain damage in hypoxic-ischemic rats. However, pups treated with HUCB stem cells and saline-group showed comparable impairments.

Our findings are similar to the study of Mäkinen et al[35], but contrast with most of the investigators. HUCB stem cells have been reported by several groups to enhance drastically functional recovery after ischemic injury in adult rats, delivered either intracerebrally or intravenously. The mechanisms for previously reported neuroprotection are not know but may include cytokines and trophic factors produced by HUCB cells [15, 16, 36-38].

In neonatal brain damage models, few studies about stem cell therapy have been reported and there is a wide range of used methods [17, 39-41]. Ma et al. used a hypoxic–ischemic encephalopathy mouse model similar to ours intending to study the effect of transplantation of stem cells. They showed that the transplanted cells

significantly improve the deficit in learning and memory induced by hypoxia-ischemia 8 months post-transplantation. However, this study used mice embryonic stem cells injected directly in lesion site [39].

The route of delivery may influence the recovery after cellular transplantation. Until the moment, no study used the acute transplant (24h after insult) of stem cell in neonatal rat by intravenous delivery. Intravenous administration has the advantage of being less invasive but raises the problem of cell homing to organs and target site [42]. Borlongan et al. showed that in contrast with intracerebral transplantation, intravenous delivery of bone marrow stem cells produced only limited functional effects [43].

Timing to transplantation after injury also is a critical factor in initiating the process of repair and will depend on the cell type. If a treatment strategy focuses on neuroprotective mechanisms, acute delivery of cells will be critical once the ischemic brain elicits a strong inflammatory response by chemokines about 24 h post-insult. If cell survival is important, then late transplanting, after inflammation has subsided, could be beneficial [37, 42-44]. However, the blood brain barrier (BBB) is an obstacle for stem cell therapy in neurogenerative disease [45]. Borlongan et al. reported that BBB opening produced by middle cerebral artery occlusion was not permissive enough to allow central nervous system entry of graft-derived trophic factors. In that study, improved behavioral functions were observed only in rats treated with cord blood stem cells associated to Mannitol [13].

In this study, histological analyses showed that neonatal hypoxia-ischemia resulted in an extensive infarcted area and that intravenous injection of HUCB cells also did not change the severity of morphological damage. However, we emphasize that there was not significant difference in volume of right hemisphere between HUCB cells and sham-operated group, suggesting a tendency to regeneration. Our hypothesis is that the sample size was not sufficient and the histological evaluations follow-up was short. Evidence demonstrates that despite of functional recovery in neonatal hypoxia-ischemia and stroke animals, there is not a decrease in infarct size [13, 17, 37]. In addition, most studies have observed that the number of cells that enter brain is relatively small or absent and the treatment benefit of HUCB stem cells may be related to the migration activity of progenitor cells [13, 15, 37]. Borlongan et al. [43] suggests that the few detected intravenous delivered cell grafts, when compared to intracerebral cell grafts, were not sufficient to produce histological and functional recovery.

Despite of controversies, immunosuppressive treatment is a key determinant in long-term graft survival in xenograft paradigms [13, 46]. The mechanisms that lead to rejection in transplantation to the central nervous system are not completely understood. Several investigations suggest that the T-cell mediated immune reaction plays a significant role in graft rejection and that interspecies incompatibility contributes significantly to phagocytosis of xenogeneic cells by macrophages [47, 48]. We emphasize that we still do not have evidences of HUCB cells migration to brain and of host immune response to the transplanted cells.

In addition, the unilateral carotid artery permanent occlusion results in reduction of cerebral blood flow within the various structures of the hemisphere ipsilateral to the vascular occlusion [49, 50]. We speculated that low perfusion in distal field regions (border zones) may contribute to a migration difficulty of HUCB cells to injured structures, what may also explain our behavioral and histological results.

In conclusion, the present study suggests that, according to our experimental design, hypoxic-ischemic animals with severe brain damage treated with HUCB cells did not show better histological and functional outcomes. Aspects such as dose, timing potential of peripheral route of HUCB delivery, the immunosuppression and use of associated therapies need to be investigated in depth before clinical application of cellular therapy to optimize neuroprotection and, consequently, neurobehavioral outcomes.

REFERENCES

1. Johnston MV, Trescher WH, Ishida A, et al. Novel treatments after experimental brain injury. **Semin Neonatol** 2000;5:75-86.
 2. Lee SR, Kim SP, Kim JE. Protective effect of topiramate against hippocampal neuronal damage after global ischemia in the gerbils. **Neurosci Lett** 2000;281:183-186.
 3. Shankaran S, Laptook A. Challenge of conducting trials of neuroprotection in the asphyxiated term infant. **Semin Perinatol** 2003;27:320-332.
 4. Park KI. Transplantation of neural stem cells: cellular & gene therapy for hypoxic-ischemic brain injury. **Yonsei Med J** 2000;41:825-835.
 5. Daley GQ, Goodell MA, Snyder EY. Realistic prospects for stem cell therapeutics. **Hematology** 2003:398-418.
-

6. Haas S, Weidner N, Winkler J. Adult stem cell therapy in stroke. **Curr Opin Neurol** 2005;18:59-64.
 7. Kaji EH, Leiden JM. Gene and stem cell therapies. **Jama** 2001;285:545-550.
 8. Korbling M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? **N Engl J Med** 2003;349:570-582.
 9. Li L, Xie T. Stem Cell Niche: Structure and Function. **Annu Rev Cell Dev Biol** 2005.
 10. Mayhall EA, Paffett-Lugassy N, Zon LI. The clinical potential of stem cells. **Curr Opin Cell Biol** 2004;16:713-720.
 11. Rice CM, Scolding NJ. Adult stem cells--reprogramming neurological repair? **Lancet** 2004;364:193-199.
 12. Santner-Nanan B, Peek MJ, McCullagh P, et al. Therapeutic potential of stem cells in perinatal medicine. **Aust N Z J Obstet Gynaecol** 2005;45:102-107.
 13. Borlongan CV, Hadman M, Sanberg CD, et al. Central nervous system entry of peripherally injected umbilical cord blood cells is not required for neuroprotection in stroke. **Stroke** 2004;35:2385-2389.
 14. Chen N, Hudson JE, Walczak P, et al. Human umbilical cord blood progenitors: the potential of these hematopoietic cells to become neural. **Stem Cells** 2005;23:1560-1570.
 15. Vendrame M, Cassady J, Newcomb J, et al. Infusion of human umbilical cord blood cells in a rat model of stroke dose-dependently rescues behavioral deficits and reduces infarct volume. **Stroke** 2004;35:2390-2395.
 16. Vendrame M, Gemma C, de Mesquita D, et al. Anti-inflammatory effects of human cord blood cells in a rat model of stroke. **Stem Cells Dev** 2005;14:595-604.
 17. Meier C, Middelani J, Wasielewski B, et al. Spastic paresis after perinatal brain damage in rats is reduced by human cord blood mononuclear cells. **Pediatr Res** 2006;59:244-249.
 18. Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. **Ann Neurol** 1981;9:131-141.
 19. Rossato JI, Bevilaqua LR, Myskiw JC, et al. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. **Learn Mem** 2007;14:36-46.
 20. Kumral A, Uysal N, Tugyan K, et al. Erythropoietin improves long-term spatial memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in rats. **Behav Brain Res** 2004;153:77-86.
 21. Fujimoto ST, Longhi L, Saatman KE, et al. Motor and cognitive function evaluation following experimental traumatic brain injury. **Neurosci Biobehav Rev** 2004;28:365-378.
 22. Lubics A, Reglodi D, Tamas A, et al. Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury. **Behav Brain Res** 2005;157:157-165.
 23. Modo M, Stroemer RP, Tang E, et al. Neurological sequelae and long-term behavioural assessment of rats with transient middle cerebral artery occlusion. **J Neurosci Methods** 2000;104:99-109.
-

24. Schallert T, Fleming SM, Leasure JL, et al. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. **Neuropharmacology** 2000;39:777-787.
 25. Schallert T, MT W. The Behavior of the Laboratory Rat. A Handbook with Tests. New York: Oxford University Press, 2005.
 26. Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Sydney: Academic Press, 1986.
 27. Avendano C, Roda JM, Carceller F, et al. Morphometric study of focal cerebral ischemia in rats: a stereological evaluation. **Brain Res** 1995;673:83-92.
 28. Rodrigues AL, Arteni NS, Abel C, et al. Tactile stimulation and maternal separation prevent hippocampal damage in rats submitted to neonatal hypoxia-ischemia. **Brain Res** 2004;1002:94-99.
 29. Balduini W, De Angelis V, Mazzoni E, et al. Long-lasting behavioral alterations following a hypoxic/ischemic brain injury in neonatal rats. **Brain Res** 2000;859:318-325.
 30. Golan H, Huleihel M. The effect of prenatal hypoxia on brain development: short- and long-term consequences demonstrated in rodent models. **Dev Sci** 2006;9:338-349.
 31. Jansen EM, Low WC. Long-term effects of neonatal ischemic-hypoxic brain injury on sensorimotor and locomotor tasks in rats. **Behav Brain Res** 1996;78:189-194.
 32. Ten VS, Bradley-Moore M, Gingrich JA, et al. Brain injury and neurofunctional deficit in neonatal mice with hypoxic-ischemic encephalopathy. **Behav Brain Res** 2003;145:209-219.
 33. Yager JY, Thornhill JA. The effect of age on susceptibility to hypoxic-ischemic brain damage. **Neurosci Biobehav Rev** 1997;21:167-174.
 34. Yager JY, Wright S, Armstrong EA, et al. The influence of aging on recovery following ischemic brain damage. **Behav Brain Res** 2006;173:171-180.
 35. Makinen S, Kekarainen T, Nystedt J, et al. Human umbilical cord blood cells do not improve sensorimotor or cognitive outcome following transient middle cerebral artery occlusion in rats. **Brain Res** 2006;1123:207-215.
 36. Willing AE, Lixian J, Milliken M, et al. Intravenous versus intrastriatal cord blood administration in a rodent model of stroke. **J Neurosci Res** 2003;73:296-307.
 37. Chen J, Sanberg PR, Li Y, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. **Stroke** 2001;32:2682-2688.
 38. Lu D, Sanberg PR, Mahmood A, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces neurological deficit in the rat after traumatic brain injury. **Cell Transplant** 2002;11:275-281.
 39. Ma J, Wang Y, Yang J, et al. Treatment of hypoxic-ischemic encephalopathy in mouse by transplantation of embryonic stem cell-derived cells. **Neurochem Int** 2007.
 40. Yasuhara T, Matsukawa N, Yu G, et al. Behavioral and histological characterization of intrahippocampal grafts of human bone marrow-derived multipotent progenitor cells in neonatal rats with hypoxic-ischemic injury. **Cell Transplant** 2006;15:231-238.
-

41. Zheng T, Rossignol C, Leibovici A, et al. Transplantation of multipotent astrocytic stem cells into a rat model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. **Brain Res** 2006;1112:99-105.
 42. Bliss T, Guzman R, Daadi M, et al. Cell transplantation therapy for stroke. **Stroke** 2007;38:817-826.
 43. Borlongan CV, Evans A, Yu G, et al. Limitations of intravenous human bone marrow CD133+ cell grafts in stroke rats. **Brain Res** 2005;1048:116-122.
 44. Sanberg PR, Willing AE, Garbuzova-Davis S, et al. Umbilical cord blood-derived stem cells and brain repair. **Ann N Y Acad Sci** 2005;1049:67-83.
 45. Neumann H. Microglia: a cellular vehicle for CNS gene therapy. **J Clin Invest** 2006;116:2857-2860.
 46. Irons H, Lind JG, Wakade CG, et al. Intracerebral xenotransplantation of GFP mouse bone marrow stromal cells in intact and stroke rat brain: graft survival and immunologic response. **Cell Transplant** 2004;13:283-294.
 47. Wennersten A, Holmin S, Al Nimer F, et al. Sustained survival of xenografted human neural stem/progenitor cells in experimental brain trauma despite discontinuation of immunosuppression. **Exp Neurol** 2006;199:339-347.
 48. Wang H, VerHalen J, Madariaga ML, et al. Attenuation of phagocytosis of xenogeneic cells by manipulating CD47. **Blood** 2007;109:836-842.
 49. Vannucci RC, Vannucci SJ. A model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. **Ann N Y Acad Sci** 1997;835:234-249.
 50. Vannucci RC, Vannucci SJ. Perinatal hypoxic-ischemic brain damage: evolution of an animal model. **Dev Neurosci** 2005;27:81-86.
-

Table 1. Motor performance in three groups of study.

Test/Group	HUCB cells	Saline	Sham-operated	P value
Locomotion time (sec): means \pm SD	107.09 \pm 18.61	99.75 \pm 18.68	109.13 \pm 13.47	0.44
Number of rearing: means \pm SD	31.64 \pm 10.230	35.75 \pm 6.995	29.38 \pm 5.706	0.21
Number of crossings: means \pm SD	115.55 \pm 21.72	113.17 \pm 19.05	124.63 \pm 12.66	0.40
Ledged beam walking (%): means \pm SD	10.94 \pm 3.36	8.62 \pm 2.05	10.98 \pm 4.16	0.15
Grid walking (%): median (IR 25-75%)	16.67 (12.70 – 20.00)	11.24 (9.76 – 15.69)	5.72 (0 – 15.21)	0.07
Cylinder test (%): median (IR 25-75%)	12.90 (1.6 – 26.67)	13.17 (5.45 – 51.19)	2.94 (0 – 6.9)	0.05

Variables with normal distribution are presented as means \pm SD and are compared using ANOVA one-way. Otherwise, variables are presented as median (interquartile range [IR]) and are compared using the Kruskal-Wallis test. HUCB = human umbilical cord blood.

Table 2. Volume analysis of subareas of left and right hemispheres in HUCB cells, saline and sham-operated groups.

Group	HUCB cells		Saline		Sham-operated	
	Left	Right	Left	Right	Left	Right
Anterior volume (mm ³)	126.44 \pm 15.65	96.55 \pm 32.12*	123.85 \pm 31.59	82.92 \pm 19.99*	122.71 \pm 26.09	109.49 \pm 19.23
Midle volume (mm ³)	225.65 \pm 31.10	156.13 \pm 76.42†	231.69 \pm 37.49	121.32 \pm 69.27**#	221.01 \pm 31.32	216.04 \pm 32.94
Posterior volume (mm ³)	257.29 \pm 26.60	179.29 \pm 81.35†	255.25 \pm 19.23	137.78 \pm 72.81**#	217.64 \pm 45.23	231.13 \pm 19.46

Data expressed as means \pm SD. *p<0.05 vs contralateral hemisphere. # p < 0.01 vs right hemisphere of sham-operated rats. †p<0.01 vs contralateral hemisphere. ** p< 0.001 vs contralateral hemisphere. HUCB = human umbilical cord blood.

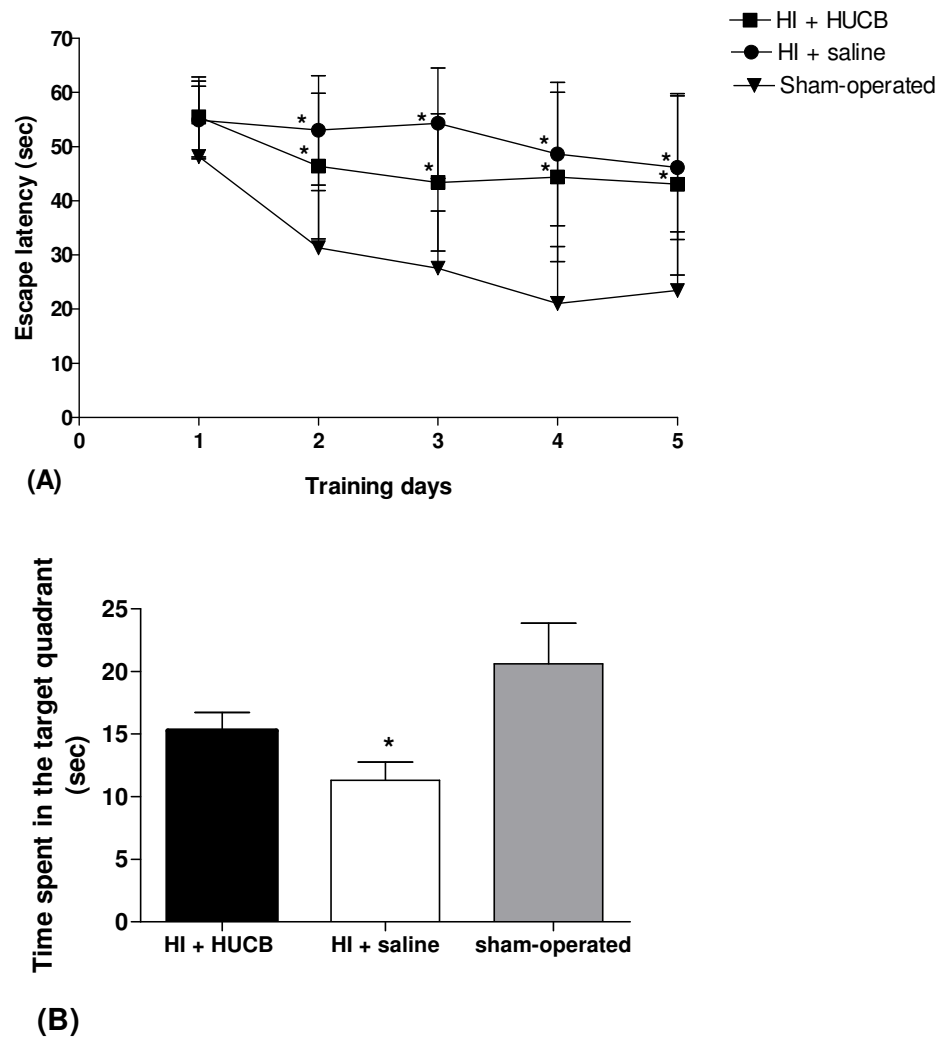


Figure 1. Morris water maze test. (A) Mean daily latencies to reach platform. * $p < 0.01$ vs. sham-operated. (B) Time spent in the target quadrant in the probe trial. * $p < 0.05$ vs. sham-operated. Data expressed as means \pm SD. HI (hypoxia-ischemia), HUCB (human umbilical cord blood).

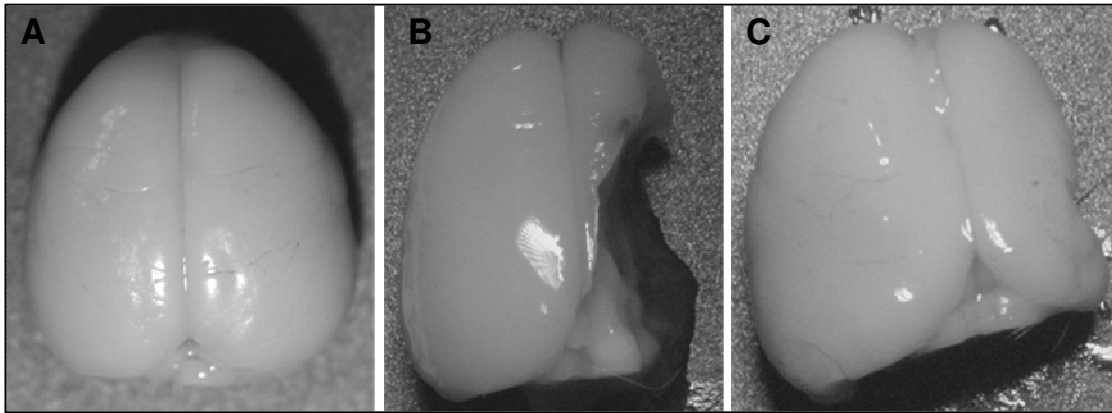


Figure 2. Gross appearance of rat brain in sham-operated (A), saline (B) and human umbilical cord blood (C) groups three weeks after hypoxic-ischemic injury. Images were captured after perfusion and cerebellum was excluded.



Figure 3. The mean hemisphere volume in all groups. There was a loss of right hemisphere volume after hypoxia-ischemia induction. * $p < 0.01$ vs contralateral hemisphere. ** $p < 0.01$ vs right hemisphere of sham-operated group. There was no difference between the two hemispheres in the sham-operated rats. Data expressed as means \pm DP.

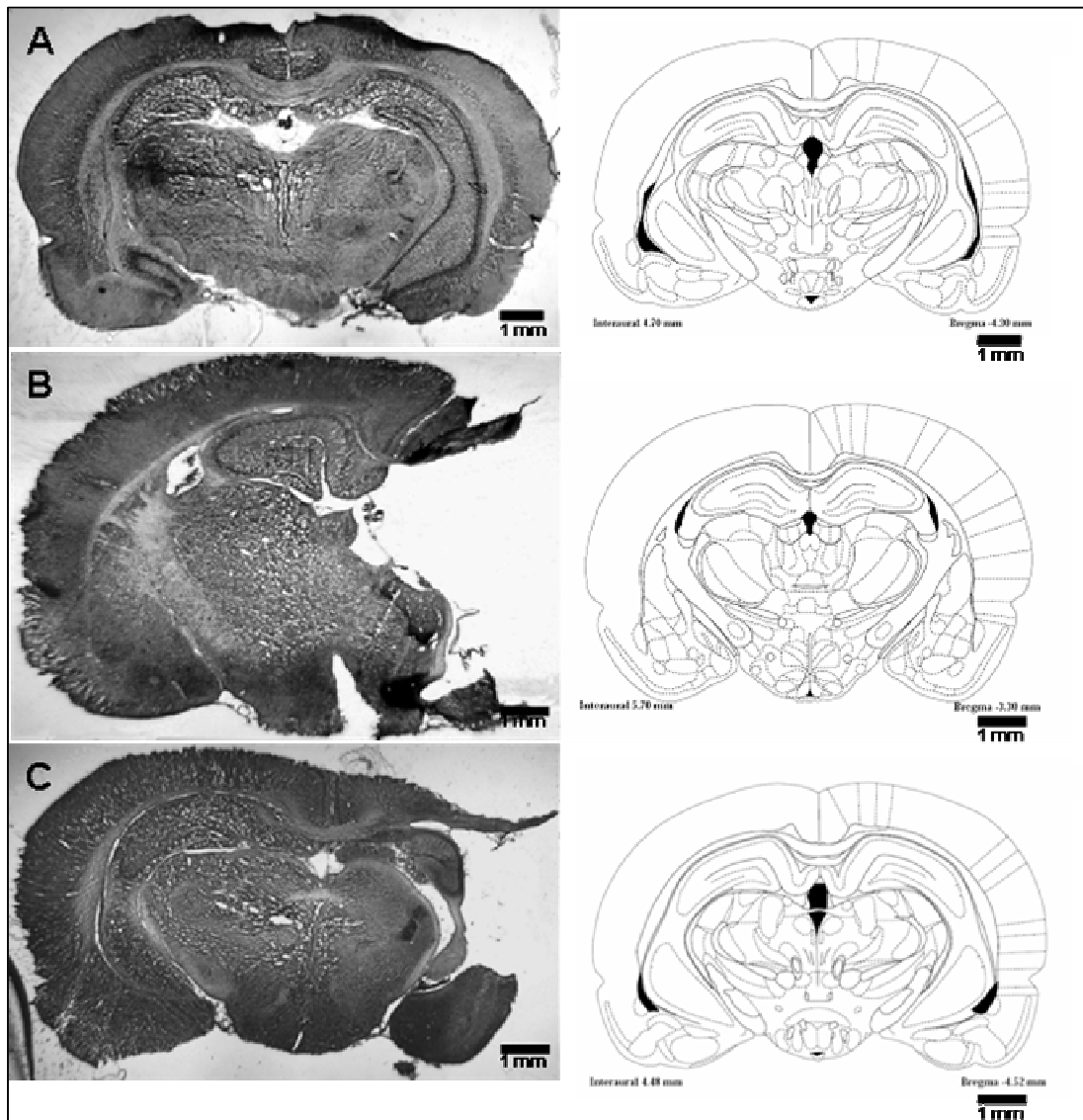


Figure 4. Digitized images of Nissl-stained coronal sections of brain rat. A. Sham-operated rat. B. Rat administered with saline solution three weeks post injury showed cystic infarct ipsilateral to carotid artery occlusion. C. Rat treated with HUCB cells showed right hemisphere also damaged. The schematic drawings are from Paxinos and Watson's atlas [26].



CAPÍTULO IV





Conclusões



4 CONCLUSÕES

1) O modelo animal de hipóxia-isquemia neonatal em ratos resultou em visível área de infarto no hemisfério ipsilateral à oclusão da artéria carótida direita.

2) Os testes neuromotores não detectaram déficits neurológicos nos animais submetidos ao modelo de hipóxia-isquemia. Houve apenas uma tendência à assimetria de uso das patas anteriores no teste do cilindro e uma tendência a um maior número de deslizos no teste da grade.

3) Os ratos submetidos ao modelo animal de hipóxia-isquemia neonatal apresentaram um significativo prejuízo na memória de orientação espacial.

4) O desempenho dos animais tratados com células-tronco de cordão umbilical humano foi similar ao grupo tratado com solução salina no teste de memória de orientação espacial.

5) A injeção intravenosa de células-tronco de cordão umbilical humano não resultou na redução do tamanho da lesão histológica no hemisfério ipsilateral à oclusão da artéria carótida direita.



CAPÍTULO V





Resultados complementares



5 RESULTADOS COMPLEMENTARES

5.1 Resultados da fase I (piloto) no labirinto aquático de Morris

Tabela V.1. Resultados do piloto no labirinto aquático de Morris três semanas após a indução da lesão.

Variável	HI (n=6)	Sham (n=4)	Valor de p**
Latência de escape*(s)	53,17 ± 15,32	12 ± 6,8	0,001
Tempo no quadrante (s)	9,83 ± 3,02	20,50 ± 3,40	0,05

Dados expressos como média ± desvio padrão. *Latência de escape no 6º dia, após retirada da plataforma. HI (hipóxia-isquemia). ** Teste t de Student.

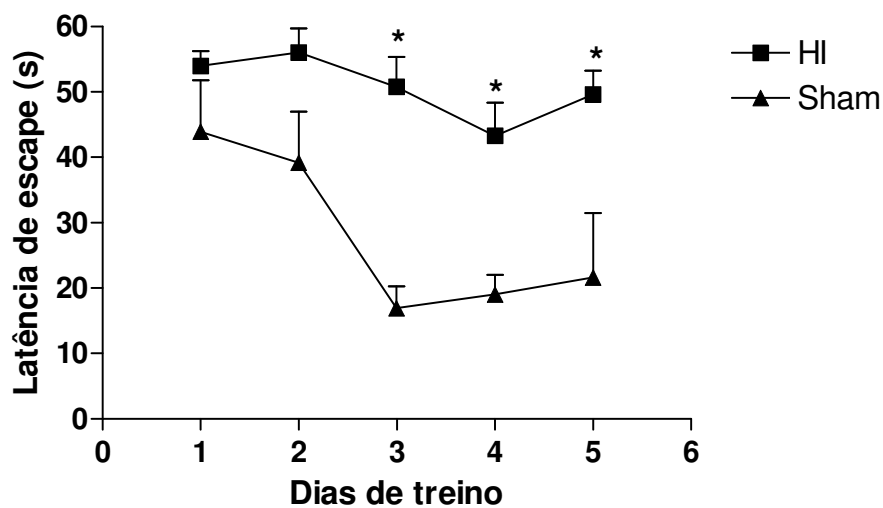


Figura V-1: Latência de escape no labirinto aquático de Morris nos cinco dias de treino. Dados expressos como média ± desvio padrão. *p<0,05. HI (hipóxia-isquemia).

5.2 Correlação entre o método de delineamento e a contagem de pontos

O resultado do volume dos hemisférios pelo método de delineamento e pelo método de contagem de pontos mostra uma correlação de Pearson de 0,99 ($p < 0,01$), indicando que ambos os métodos utilizados mostraram estimativas de volume similares.

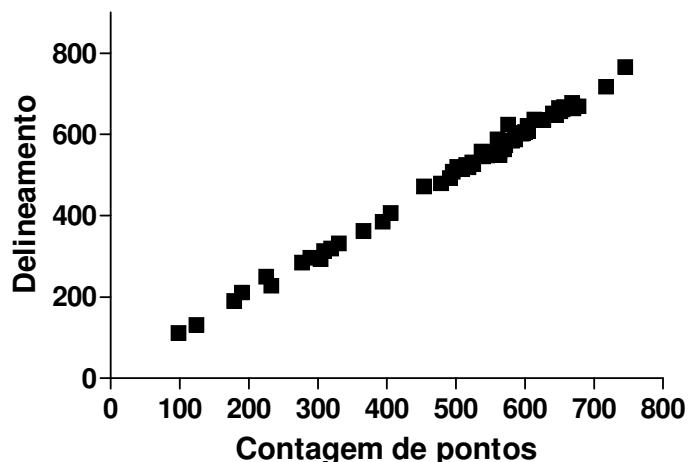


Figura V-2: Gráfico de dispersão, mostrando a correlação entre a contagem de pontos e o método de delineamento para o cálculo do volume.

5.3 Avaliação imuno-histoquímica

Para a avaliação da migração das células-tronco, um animal submetido ao modelo de hipóxia-isquemia neonatal foi sacrificado na primeira semana após o transplante de células-tronco de cordão umbilical humano. Os encéfalos foram cuidadosamente retirados e congelados em nitrogênio líquido com crioproteção do isopentano. Cortes coronais de 15 μ m foram obtidas de um criostato e colocadas em lâminas histológicas preparadas com poly-L-lysina e armazenadas a -20°C.

As fatias adquiridas foram tratadas com o anticorpo monoclonal anti-núcleo humano (MAB 1281, *Chemicon*, Canadá) diluído em 1:100. As lâminas foram lavadas em PBS (salina fosfatada tamponada) por 5 minutos em temperatura ambiente. O anticorpo anti-camundongo poli-HRP foi usado como anticorpo secundário por um período de incubação de 45 minutos em temperatura ambiente (Kit 2762, *Chemicon*, Canadá). Após lavagem em PBS, a solução de DAB (diaminobenzidina) foi adicionada por 5 minutos. As células-tronco derivadas de cordão umbilical humano foram identificadas pela marcação imuno-histoquímica com o anticorpo MAB1281.¹⁻³

Resultados preliminares são mostrados na Figura V-3. Observou-se a presença de algumas marcações do anticorpo MAB1281 (seta) no hemisfério ipsilateral à oclusão da artéria carótida que posteriormente serão analisadas por imunofluorescência para confirmação da migração das células transplantadas.

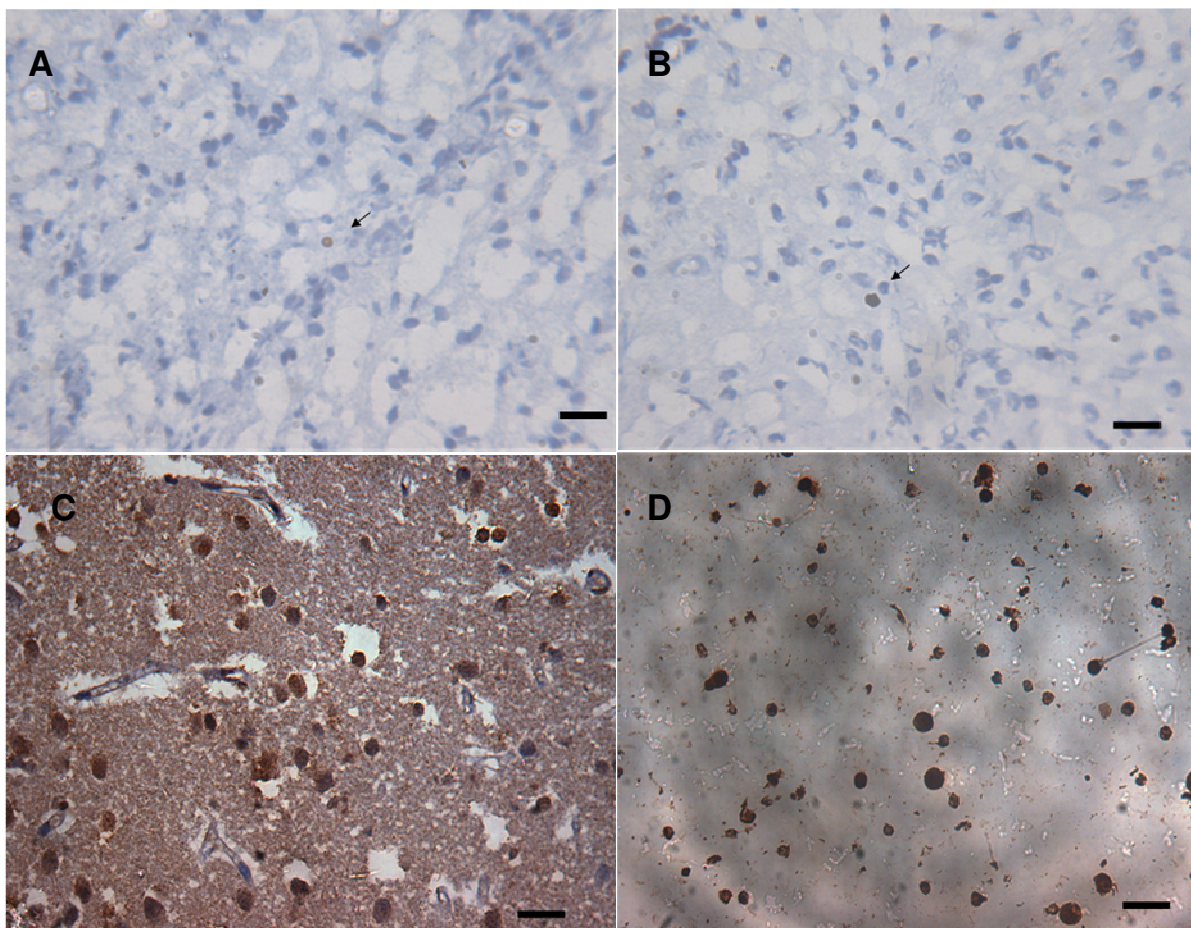


Figura V-3: Avaliação imuno-histoquímica do cérebro do rato 7 dias após o transplante de células-tronco de cordão umbilical humano. A e B. Presença de algumas marcações MAB 1281+ no hemisfério ipsilateral a oclusão da artéria carótida. C. Controle positivo do anticorpo MAB 1281 em um tecido neuronal humano. D. Controle positivo do anticorpo MAB 1281 em um esfregaço de sangue de cordão humano. Barra de calibração 20 μ m. Aumento 40x.

Referências bibliográficas

- 1 Chen J, Sanberg PR, Li Y, Wang L, Lu M, Willing AE, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke* 2001;32:2682-2688.
- 2 Li Y, Chen J, Chen X, Wang L, Gautam S, Xu Y, et al. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: Neurotrophins and functional recovery. *Neurology* 2002;59:514-523.
- 3 Nan Z, Grande A, Sanberg CD, Sanberg PR, Low WC. Infusion of human umbilical cord blood ameliorates neurologic deficits in rats with hemorrhagic brain injury. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1049:84-96.

Anexo

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Durante a gravidez, o oxigênio e nutrientes essenciais passam do sangue materno para o bebê através da placenta e do cordão umbilical. Após o parto, o sangue que permanece no cordão umbilical e na placenta é geralmente descartado. Este sangue contém um grande número de células-tronco, que são células jovens, que conseguem se reproduzir em células de seus respectivos tecidos. Pesquisas em andamento buscam utilizar essas células na regeneração de órgãos, como o coração e o cérebro, pois estas células podem se transformar em diversas outras células, tais como, células sangüíneas, musculares e nervosas (neurônios).

O objetivo deste trabalho é avaliar se as células-tronco de cordão umbilical humano podem tratar a lesão cerebral de ratos que sofreram asfixia no período do nascimento.

Para a coleta do sangue, após o nascimento, o cordão umbilical é pinçado (lacrado com uma pinça) e separado do bebê, cortando a ligação entre o bebê e a placenta. A quantidade de sangue (cerca de 70 - 100 ml) que permanece no cordão e na placenta é drenada para uma bolsa de coleta. Em seguida, já no laboratório de processamento, as células-tronco são separadas e preparadas para o congelamento. Durante este procedimento de coleta, não há nenhum risco para a mãe e para o bebê. As equipes de coleta atuam somente com o consentimento do obstetra, garantindo que nada interfira no parto.

Eu, (responsável) fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada. Recebi informação a respeito dos procedimentos e esclareci minhas dúvidas. Sei que minha participação no estudo é voluntária e gratuita e que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim eu o desejar. A mestrande Simone de Paula certificou-me de que todos os dados desta pesquisa referentes à mim e ao meu bebê serão confidenciais, bem como o seu tratamento não será modificado em razão desta pesquisa e terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, face a estas informações. Concordo que as amostras de sangue de cordão umbilical e placenta obtidas serão utilizadas apenas com finalidade de pesquisa experimental.

Fui informado que caso existam danos à minha saúde, causados diretamente pela pesquisa, terei direito a tratamento médico e indenização conforme estabelece

a lei. Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Caso tiver novas perguntas sobre este estudo, posso chamar pela Mestranda Simone de Paula no telefone (51) 84447625. Para qualquer pergunta sobre os meus direitos como participante deste estudo ou se penso que fui prejudicado pela minha participação, posso chamar pelo orientador da pesquisa, Dr. Jaderson Costa da Costa.

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Assinatura do Paciente

Nome do Paciente

___/___/___

Assinatura do Pesquisador

Apêndice

BANCO DE DADOS

Banco de dados disponibilizado em mídia digital (CD).
